

**Einfluss von Aquaporinen auf die
Blattwachstumsdynamik von *Nicotiana
tabacum* (L.) und *Arabidopsis thaliana*
(L.) Heynh.**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen
Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Michaela Ernst
aus
Krefeld

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Schurr
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Lüttge

Tag der Einreichung: 15. 05.07
Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.07

Darmstadt 2007
D17

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Spezifität der Aquaporine	1
1.2	Physiologische Funktion	2
1.2.1	Aquaporine als Osmo-, bzw. Turgorsensoren	3
1.3	Keimung	5
1.4	Wachstum	7
1.4.1	Allgemeine Wachstumsgleichung	7
1.4.2	Wachstumsmodelle	8
1.4.3	Hinweise einer Beteiligung von Aquaporinen am Expansionswachstum	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Pflanzen und Anzuchtbedingungen	11
2.1.1	Versuchspflanzen	11
2.1.2	Pflanzenanzucht	12
2.2	Nachweis der transgenen DNA	14
2.2.1	DNA-Isolierung	14
2.2.2	PCR-Analyse	14
2.3	Analyse des Blattwachstums	15
2.3.1	Definition von Wachstumsraten	16
2.3.2	Messung der Blattflächen mit dem Lineal	16
2.3.3	Nummerierung der Blattpositionen des Tabaks	17
2.3.4	Bestimmung der Blattflächen mit Hilfe des automatischen Screeningsystems - Growscreen	17
2.3.5	Digitale Bildsequenz-Analyse	19
2.4	Biomassebestimmung	21
2.5	Photosynthesemessungen	21
2.5.1	Gaswechsellmessungen	21
2.5.2	Fluoreszenzmessungen	23
2.6	Keimungsversuche	24
3	Ergebnisse	27
3.1	Nachweis der transgenen DNA	27
3.2	Fehlerabschätzung des Screeningverfahrens	27
3.3	Dynamik des Blattwachstums	36
3.3.1	<i>N. tabacum</i> – Wachstum unter Gewächshausbedingungen	36
3.3.2	<i>N. tabacum</i> – Wachstum unter Klimakammerbedingungen	40

3.3.3	DISP-Messungen an Tabakblättern	44
3.3.4	<i>A.thaliana</i> - Wachstumsverhalten der T-DNA Insertions- mutanten	49
3.3.5	Relativer Wassergehalt der <i>Arabidopsis</i> T-DNA-Insertionsmutanten	49
3.4	Photosynthesemessungen	51
3.4.1	Gaswechsel	52
3.4.2	Fluoreszenzmessungen	55
3.5	Kinetik des Keimungsprozesses	59
4	Diskussion	63
4.1	Dynamik des Blattwachstums	63
4.2	Keimung	70
4.3	Gaswechsel	73
4.4	Fehlerabschätzung des Screeningverfahrens	75
4.5	Zusammenfassung	78
	Literatur	78
	A Parameterdatei - Screening	91
	B Filtereinstellungen für die DISP-Analyse	93
	C Gaswechsel - A/C_i-Kurven	95

Abkürzungsverzeichnis

A_N	Netto-Photosyntheserate ($\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
C_i	intrazelluläre CO_2 -Konzentration ($\mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$)
g_s	stomatäre Leitfähigkeit ($\text{mol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
AOI	area of interest
AQP	Aquaporin
BR	Brassinosteroide
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	charge coupled device, Chip zur Aufnahme in digitalen Kameras
DISP	Digital Image Sequence Processing Method, digitale Bildsequenz-Verarbeitung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETR	Elektronentransportrate des Photosystems II
Fa	Firma
Fa	Firma
FG	Frischgewicht
FZJ	Forschungszentrum Jülich
GA	Gibberellin
h	Stunde
IR	Infrarot
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP	major intrinsic proteins
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
NaCl	Natriumchlorid
NIP	nodulin like intrinsic proteins
NPQ	non-photochemical quenching, nicht-photochemische Energielöschung des Photosystems II
NtAQP1	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
PCR	Polymerase chain reaktion
PIP	plasma intrinsic proteins

PPFD	photosynthetic photon flux density, photosynthetische Photonenflussdichte
RGR	relativ growth rate, relative Wachstumsrate
RNA	Ribonukleinsäure
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
RWG	relativer Wassergehalt
s	Sekunde
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SE	standard error, Standardfehler
SIP	small intrinsic proteins
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TIP	tonoplast intrinsic proteins
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Kapitel 1

Einleitung

Seit den 1990er Jahren ist nachgewiesen, dass Aquaporine, intrinsische Membranproteine, den Wassertransport über biologische Membranen erleichtern; dabei folgt das Wasser dem osmotischen Gradienten. AQP1 (CHIP28), das in der Erythrocytenmembran lokalisiert ist, war das erste Protein, bei dem gezeigt werden konnte, dass es ein selektiver Wasserkanal ist [Preston et al., 1992]. Kurze Zeit darauf konnte dies auch für ein pflanzliches Aquaporin, das γ -TIP, nachgewiesen werden [Maurel et al., 1993].

1.1 Struktur und Spezifität der Aquaporine

Aquaporine gehören zur Superfamilie der MIP-homologen Proteine (major intrinsic proteins) und sind sowohl in pflanzlichen und tierischen Organismen als auch in Bakterien nachgewiesen. Die Diversität ist in Pflanzen größer als in tierischen Organismen. In *Arabidopsis* sind 35 MIP-Homologe bekannt [Johanson et al., 2001], in *Zea mays* 36 exprimierte Aquaporin Gene [Chaumont et al., 2001].

Die Familie der Aquaporine lässt sich weiter in vier Unterfamilien gliedern: die plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), die tonoplast intrinsic proteins (TIPs), die nodulin like intrinsic proteins (NIPs), die nach dem NOD26 aus den Wurzelknöllchen von *Glycine max* benannt wurden, und die small intrinsic proteins (SIPs). Die PIPs bilden die größte Unterfamilie mit zwei Untergruppen, PIP1 und PIP2, die sich in der Länge ihrer N- und C-Termini, und ihrer Wasserpermeabilität, unterscheiden. In *Xenopus* Oozyten oder Hefe Vesikeln zeigen PIP2 Proteine eine hohe H_2O -Leitfähigkeit, während PIP1 Proteine häufig inaktiv sind oder nur niedrige Leitfähigkeiten zeigen [Daniels et al., 1994, Chaumont et al., 2000, Biela et al., 1999, Suga and Maeshima, 2004, Weig et al., 1997].

Aquaporine sind aus sechs transmembranen α -Helices (Helices 1-6) aufgebaut, die durch fünf interhelikale Schleifen (A-E) verbunden sind, weiterhin besitzen sie cytosolische N- und C-Termini. Die Schleifen B und E, bilden mit kurzen, hydrophoben Abschnitten und einem stark konservierten hydrophilen Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin), auch als NPA-Box bezeichnet, eine hygroskopische Pore nach dem Sanduhr-Modell [Jung et al., 1994]. Von dieser Struktur gibt es auch Abweichungen, so bei einigen *Arabidopsis* und Mais NIP und SIP Isoformen [Chaumont et al., 2001]. Dort ist der Alanin Rest durch andere Ami-

nosäuren ersetzt. Aquaporine bilden Tetramere innerhalb der Membran, dies scheint wichtig zu sein für die Stabilität und Faltung der Proteine. Es gibt ferner Hinweise, die auf die Existenz einer fünften Pore deuten (in der Mitte des Tetramers), durch die Ionen geleitet werden können [Yu et al., 2006]. Pflanzliche MIPs zeigen Unterschiede hinsichtlich ihrer Transportselektivität. Neben solchen, die spezifisch H_2O transportieren [Maurel et al., 1993], gibt es andere, die zusätzlich Glycerin [Biela et al., 1999], NH_3 , NH_4^+ [Niemitz and Tyerman, 2000, Jahn et al., 2004]; Bor [Dordas et al., 2000], oder auch CO_2 [Uehlein et al., 2003] transportieren können.

1.2 Physiologische Funktion

Aquaporine sind an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt, die einen raschen Wassertransport über die Membran erfordern; so bei den Schließbewegungen der Stomata [Sarda et al., 1997] oder den nastischen Bewegungen der Pulvini von *Mimosa pudica* [Fleurat-Lessard et al., 1997] und *Samanea saman* [Moshelion et al., 2002], und den Blattbewegungen von *N.tabacum* [Siefritz et al., 2004]. Die Gene vieler Aquaporine werden gewebs- bzw. entwicklungsspezifisch exprimiert. Sie finden sich häufig in Geweben mit starker Zellexpansion, ebenso in vaskulären und deren umliegenden Geweben an den überleitenden Stellen des Wassertransportes zwischen symplastischem und apoplastischen Wassertransport [Kaldenhoff et al., 1995, Daniels et al., 1996, Otto and Kaldenhoff, 2000].

Im folgenden wird kurz auf die Funktion der PIPs eingegangen werden, da die analysierten Tabak- und Arabidopsis Pflanzen reduzierte PIP1-, oder PIP2 Gehalte aufweisen.

Die physiologische Funktion dieser beiden Unterfamilien ist trotz ihrer Sequenzähnlichkeiten wahrscheinlich verschieden. Vertreter der beiden Unterfamilien finden sich in fast allen Geweben der Pflanzen: in den Wurzeln, im Spross, in den Blättern, den Samen und den reproduktiven Organen. Trotz der niedrigen Leitfähigkeiten in den *Xenopus* Oozyten scheinen auch PIP1 Isoformen eine Funktion bei der Wasserleitung und der Regulation transmembraner Wasserflüsse zu besitzen. So zeigten Wurzeln von antisense Tabakpflanzen mit reduzierter NtAQP1 Expression, eine verminderte hydraulische Leitfähigkeit und waren weniger resistent gegen Trockenstress [Siefritz et al., 2002]. Ähnliches ließ sich bei *Arabidopsis* Pflanzen beobachten, welche entweder ein antisense *AtPIP1*;1 oder *AtPIP2*;3 Gen exprimierten, bzw. beide Gene (double antisense). Diese Pflanzen zeigten reduzierte Transkript oder Proteinlevel für mehrere PIP1 und/oder PIP2 Homolge [Kaldenhoff et al., 1998, Martre et al., 2002]. Auf physiologischer Ebene zeigte sich eine verringerte hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel und, im Gegensatz zu den Tabakpflanzen, ein erhöhtes Spross/Wurzel Verhältnis bezogen auf das Trockengewicht [Kaldenhoff et al., 1998]. PIP Proteine beeinflussen auch die nastischen Blattbewegung bei *Samanea saman* [Moshelion et al., 2002] und Tabak [Siefritz et al., 2004]. Neben einer H_2O Leitfähigkeit gibt es Hinweise auf eine CO_2 -Leitfähigkeit der Aquaporine [Uehlein et al., 2003] und einer *in vivo* Beteiligung des NtAQP1 an der Mesophyll-Leitfähigkeit für CO_2 [Flexas et al., 2006].

1.2.1 Aquaporine als Osmo-, bzw. Turgorsensoren

Hill et al. [Hill et al., 2004] schlagen ein Modell für die Funktion von Aquaporinen jenseits einer Erhöhung der Wasserleitfähigkeit der Membranen vor. Ohne Zweifel erhöhen Aquaporine die Wasserleitfähigkeit der Membran gegenüber der reinen Lipiddoppelschicht und in vielen Fällen läuft der größte Anteil des Wassertransportes über Aquaporine. Hill et al. merken jedoch an, dass es bei vielen physiologischen Prozessen, wie z.B. dem Expansionswachstum, keinen Bedarf für solch erhöhte Flüsse gibt. Aquaporine kommen ubiquitär vor, deswegen ist anzunehmen, dass sie eine wichtige Funktion erfüllen. Dies könnte die Detektion osmotischer- oder Turgor-Druckgradienten sein. Aquaporine könnten eine Kontrolle und Detektion des Turgordrucks in pflanzlichen Zellen innerhalb von Rückkopplungsschleifen ausüben. Gerade in Zellen, die ihr Volumen ändern, z.B. während des Wachstums oder einer diurnalen Änderung des Turgordruckes, sind diese Funktionen wichtig. Die Autoren leiten diese Funktion aus der Struktur der Aquaporine und ihrer räumlichen Anordnung (Tetramere) in der Membran ab. Im Folgenden sollen diese Modelle nach Hill et al. [Hill et al., 2004] beschrieben werden.

Osmosensor-Modell

Die Anordnung von Aquaporinen zu Tetrameren scheint der von Enzymen ähnlich, bei denen vier oder mehr unabhängige katalytische oder bindende Polypeptide miteinander assoziiert sind, um eine Kooperation zu ermöglichen. Die Autoren schließen allerdings auch die Existenz einer fünften, mittleren Pore nicht aus, durch die Ionen geleitet werden könnten. Nach dem Sanduhr-Modell von Jung et al. [Jung et al., 1994] besitzen Aquaporin-Monomere einen engen, wassergefüllten Kanal, der von einem äußeren und inneren Atrium flankiert ist. Ähnlich wie bei allosterischen Enzymen ist es Aquaporinen vielleicht möglich, die Konformation zu ändern, wenn die mechanische Belastung auf die einzelnen Monomeren steigt. Der Ausschluss von gelösten Stoffen aus den Atria bewirkt einen negativen osmotischen Druck innerhalb der Atria. Ein osmotischer Gradient zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle bewirkt einen unterschiedlichen Druck auf die Atria, dadurch wird eine interne, asymmetrische Spannung zwischen den beiden Enden des Aquaporinmoleküls produziert. Genau ergibt sich diese Spannung wie folgt: Zuerst geht man davon aus, dass sowohl innerer und äußerer osmotischer Druck ($\pi = \pi_i = \pi_o$) als auch innerer und äußerer hydrostatischer Druck (P) gleich sind, dass also kein Wasser durch die Pore fließt. Nun ist aber an einer Stelle auf der Symmetrieachse der Pore der hydrostatische Druck p im Atrium geringer als in den angrenzenden Lösungen. Dieser Druckabfall wird durch die Umwandlung von osmotischem Druck in hydrostatischen Druck bei gleichzeitigem Wassergleichgewicht hervorgerufen, es gilt:

$$\Delta\mu_w = 0 = \bar{V}_w(\pi + p)$$

$\Delta\mu_w$ bezeichnet hierbei das Wasserpotential und \bar{V}_w das partielle Molvolumen. Da \bar{V}_w nicht Null ist, muss $p = -\pi$ sein. Dies erzeugt natürlich eine mechanische Belastung, diese ist aber symmetrisch sowohl zur Mittelebene als auch zur Mittelachse des Moleküls, erzeugt also keine asymmetrische Spannung.

Wenn aber $\pi_i \neq \pi_o$ ist, ist auch $p_i \neq p_o$, was zum Wasserfluss während der

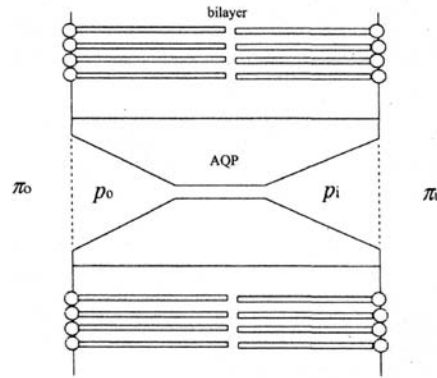


Abbildung 1.1: Schematischer Aufriss eines Aquaporins mit den entsprechenden Drücken beim Osmosensor Modell. Zeichnung aus Hill et al. [Hill et al., 2004] entnommen.

Osmose führt. Die unterschiedlichen Drücke führen zu einer mechanischen Belastung, die sich als Funktion des Druckunterschieds schreiben lässt:

$$d = f(p_o - p_i) = f(\Delta p) = f(\Delta \pi)$$

Diese Spannung bewirkt eine kleine Änderung der Monomer-Form und begünstigt damit die Änderung des Tetramers; eine anwachsende Belastung in den Monomeren führt also zur Konformationsänderung des Tetramers; von einem T-Zustand (Tension) in einen R-Zustand (Relaxed), bei dem der Querschnitt der Moleküle von rund zu elliptisch wechselt. Die Konformationsänderung des Tetramers könnte dann über Signale innerhalb der Zelle weitergegeben werden. Diese Signalmoleküle wurden bis jetzt noch nicht gefunden.

Turgorsensor-Modell

Das Turgorsensor-Modell ist eine Erweiterung des Osmosensor-Modells und gilt unter der Annahme, dass kein Wasser durch die Aquaporine fließt, sich das Wasser also im Gleichgewicht befindet. Wenn das Zytoplasma gegen die Zellwand gepresst wird, entsteht über die Lipiddoppelschicht ein großer Druckgradient. Die Drücke in beiden Atria des Aquaporins sind gleich, da kein Wasser fließt. Die Spannung im Aquaporinmolekül entsteht durch die unterschiedlichen Druckdifferenzen zwischen den Atria und den angrenzenden Teilen der Lipiddoppelschicht. Diese Spannung führt zu einer Änderung im T-R Verhältnis des Aquaporin-Tetramers, wie sie auch für das Osmosensing-System auftritt. Im Detail ergeben sich die unterschiedlichen Drücke auf die Atria wie folgt:

$$P_{cell} = -\Delta\pi = \pi_i - \pi_o \quad (I)$$

dabei bezeichnet P_{cell} den Turgordruck der Zelle, $\Delta\pi$ die osmotische Druckdifferenz, π_i den osmotischen Druck im Inneren der Zelle und π_o den osmotischen äusseren Druck. Da kein Wasser fließt gilt weiterhin:

$$p_o = -\pi_o \quad (II)$$

dies ist der Druck, der in dem äusseren Atrium wirkt; dabei bezeichnet p_o den äusseren Druck. Für den Druck der in dem inneren Atrium wirkt, gilt:

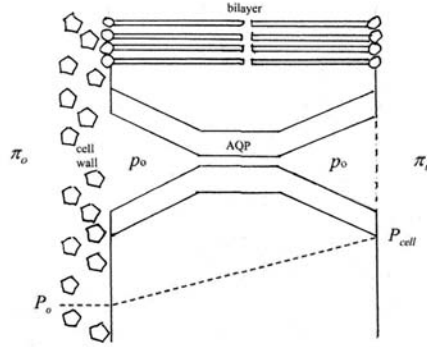


Abbildung 1.2: Schematischer Aufriss eines Aquaporins mit den entsprechenden Drücken beim Turgorsensor Modell. Zeichnung aus Hill et al. [Hill et al., 2004] entnommen.

$$p_i = -\pi_i + P_{cell} \quad (\text{III})$$

oder umgeformt:

$$P_{cell} = \pi_i + p_i \quad (\text{IV})$$

p_i bezeichnet den inneren Druck. Setzt man nun Gleichung II und III in I ein und löst nach π_0 auf, ergibt sich:

$$p_i = p_0$$

d.h. die Drücke in beiden Atria sind gleich. Die asymmetrische Belastung des Aquaporins entsteht aus der Druckdifferenz zwischen den Atria und der angrenzenden Lipiddoppelschicht; innen ist dies

$$P_{cell} - p_i$$

und außen ist dies

$$P_0 - p_0 = -p_0$$

1.3 Keimung

Die Keimung startet mit der Wasseraufnahme durch den quieszenten, trockenen Samen und endet mit der Elongation der embryonalen Achse [Bewley, 1997]. Üblicherweise wird das Austreten der Radicula aus der Testa als Keimungskriterium herangezogen. Die Wasseraufnahme durch den reifen, trockenen Samen erfolgt in drei Phasen: einer schnellen Anfangsphase, folgt eine Plateauphase. Eine stärkere Wasseraufnahme in einer dritten Phase erfolgt erst wieder nach Beendigung der Keimung, während der Streckung der embryonalen Achse. Infolge der Quellung erlangt der Same sehr rasch seine metabolische Aktivität wieder. Eine erste Änderung ist die Wiederaufnahme der respiratorischen Aktivität und die Proteinsynthese während Phase I.

Die Keimung von *N.tabacum* geschieht in zwei Schritten: auf eine Testaruptur folgt eine Endospermruptur, mit der der Keimungsprozess abgeschlossen ist. Die Testaruptur geschieht an vorbestimmten Bruchstellen der Testa und hängt von der Wasseraufnahme und dem Anschwellen des Embryos ab. Beim Tabak ist es neben der Testa vor allem das Endosperm, welches die Keimung

beschränkt. Die Reduktion des mechanischen Widerstandes dieses Gewebes ist essentiell für die Keimung. Der Verlust der Dormanz und die Keimung werden durch eine Reihe von externen und internen Faktoren gesteuert. Eine wesentliche Rolle hierbei spielen Phytohormone. Gibberellin (GA), Ethylen und Brassinosteroiden (BRs) fördern die Endospermruptur und wirken den inhibitorischen Effekten der Abscisinsäure (ABA) entgegen. β -1,3-gluconasen erleichtern die Endospermruptur und werden kurz vor Beginn der Ruptur im Endosperm, im Bereich der Mikropyle, gebildet. ABA unterdrückt die Endospermruptur, aber nicht die Testaruptur [Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006].

Hinweise einer Beteiligung von Aquaporinen an Keimungsvorgängen

Die Keimung ist ein Vorgang, bei dem während der Quellung des Samens und dem anschließenden Expansionswachstum des Embryos, in kurzer Zeit große Mengen von Wasser über Membranen fließen. Hinweise einer Beteiligung von Aquaporinen an diesen Prozessen sind seit längerem bekannt.

α -TIP und β -TIP oder TIP3s, eine Klasse von Tonoplasten Aquaporinen, werden spezifisch in Samen exprimiert [Höfte et al., 1992]. α -TIP, das in der Membran von Protein speichernden Vakuolen (PSV) vieler Pflanzenarten exprimiert ist, akkumuliert zu einem späteren Zeitpunkt der Samenreife und verschwindet während der Keimung und dem nachfolgenden Expansionswachstum des Keimlings [Johnson et al., 1989]. Es wird eine Funktion des α -TIPs bei der Zell- und Osmoregulation und der Reifung der Vakuole postuliert [Maurel et al., 1997]. Nach Abschluss der Keimung lässt sich dieses Aquaporin nicht mehr nachweisen und wird durch ein anderes Aquaporin, das γ -TIP, ersetzt. Dieses Aquaporin ist vor allem in vegetativen Geweben während des Streckungswachstums exprimiert [Ludevid et al., 1992, Maeshima et al., 1994]. Während es zahlreiche Hinweise gibt, die auf eine Beteiligung von TIPs bei der Samenreife und Keimung deuten, konnten PIP-Transkripte in trockenen, reifen Samen bisher selten nachgewiesen werden, und wenn, dann häufig auf einem niedrigen Level [Daniels et al., 1994], [Suga et al., 2001], [Willigen et al., 2006], [Gao et al., 1999]. Gao et al. [Gao et al., 1999] fanden Hinweise dafür, dass Aquaporine – BnPIP1 und Bn γ -TIP2 – während der Samenquellung und dem frühen Wachstum des Embryos von *Brassica napus* den Wassertransport über die Plasmamembran kontrollieren. Sie konnten in trockenen, reifen Brassica-Samen keine PIP1-mRNA nachweisen, jedoch stieg der mRNA-level schnell an, wenn man die Samen vorbehandelte. Dann war die Keimungsrate, sowohl unter normalen, als auch unter Stressbedingungen, erhöht. Eine Vorbehandlung der Samen hatte jedoch keinen Effekt auf Bn γ -TIP2. Daraus wird geschlossen, dass BnPIP1 wichtig für den intrazellulären Wassertransport während einer sehr frühen Keimungsphase ist. In reifen, trockenen Samen ist ein PIP1-Transkript in *Pisum sativum* nachgewiesen [Schoormans et al., 2003]. *PsPIP1-1*, *PsPIP2-1* und *PsTIP1-1*, fanden sich sowohl in den Kotyledonen der sich entwickelnden und keimenden Samen, als auch in den Wurzeln und im Spross der Keimlinge. Im reifen, trockenen Samen konnten nur Transkripte von *PsPIP1-1* nachgewiesen werden. Dies legt eine Beteiligung von *PsPIP1-1*, bzw. seiner engen Homologe, bei der Quellung und Wasseradsorption des Samens nahe.

1.4 Wachstum

Unter pflanzlichem Wachstum versteht man eine irreversible Volumenzunahme lebender Zellen. Diese Volumenzunahme wird durch Zellteilungsprozesse und vor allem durch eine Zellstreckung (Elongation) der Zellen bewirkt. Die Zellstreckung ist verbunden mit einer gleichzeitigen Wasseraufnahme der Zellen. Die treibende Kraft der Wasseraufnahme ist der Turgordruck.

1.4.1 Allgemeine Wachstumsgleichung

Die von J.Lockhart [Lockhart, 1965, Cosgrove, 1986] formulierte Gleichung beschreibt den Wachstumsprozess einer Einzelzelle. Zwei entscheidende Größen wirken limitierend, bzw. regulierend: der Turgordruck P und die Zellwandextensibilität Φ :

$$\frac{1}{V} * \frac{dV}{dt} = \Phi * (P - Y) \quad (1.1)$$

dabei bezeichnet V das Zellvolumen, $\frac{dV}{dt}$ die Rate der Volumenzunahme der Zelle, P den Turgor, Φ die Zellwandexpansibilität und Y den Schwellenwert des Turgordrucks, unterhalb dessen keine plastische Expansion auftreten kann. Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Zellstreckungsrate nur über Φ reguliert zu werden scheint, der Turgordruck bleibt während der Zellstreckung relativ konstant [Tomos and Pritchard, 1994, McQueen-Mason, 2005].

Regulation der Zellwanddehnbarkeit

Pflanzliche Zellen vergrößern während des Zelllängenwachstums ihr Volumen um das 10-100fache. Die dabei erforderliche Zellwanddehnung wird von einer Vielzahl interner (Zelltyp, Alter, Phytohormone) und externer (Licht, Wasserverfügbarkeit) Faktoren beeinflusst. Bei dieser Volumenvergrößerung erfolgt zunächst eine Druckentspannung der Zellwand (stress relaxation). Nach der Säure-Wachstumshypothese wird die Zellwand über eine Protonenabgabe der Plasmamembran angesäuert, was zu einer Druckentspannung der Zellwand führt [Rayle and Cleland, 1992, Virk and Cleland, 1988]. Die Ansäuerung bewirkt eine Aktivierung von Proteinen, Expansine, die diese pH-abhängige Dehnung katalysieren, indem sie Wasserstoffbindungen zwischen den Hemicellulosen und Mikrofibrillen lösen. Dadurch können Wandpolymere auseinandergleiten (wall polymer creep) und die Wandoberfläche vergrößern [Cosgrove, 1999]. Der physikalische Druck in der Wand verringert sich hierdurch, Wasser wird durch die Zelle aufgenommen und das Gleichgewicht zwischen Wand- und Turgordruck kann sich wieder einstellen.

Endoglucanasen und Xyloglucan-Transglycosylasen können die Matrix verändern, indem sie indirekt, über eine Veränderung der expansin-vermittelten Reaktion, auf das Auseinandergleiten der Polymere wirken [Cosgrove, 1999]. Eine Aktivierung dieser Proteine bewirkt ebenso eine Zellwandeweichung wie Expansin.

Daneben beeinflusst die Calcium-Konzentration im Apoplasten die Zellwandstabilität. Calcium-Kationen komplexieren negativ geladene Uronsäuregruppen der Pektine und verleihen so der Zellwand Festigkeit [Trewavas and Malho, 1997].

1.4.2 Wachstumsmodelle

Um das Gesamtwachstum einer Pflanze, bzw. einer Pflanzenpopulation zu beschreiben, sind mathematische Modelle notwendig. Da ein Schwerpunkt der Arbeit in dem Vergleich der Wachstumsdynamiken verschiedener Pflanzen lag, soll an dieser Stelle kurz auf die wichtigsten Funktionen eingegangen werden.

Es gibt verschiedene Ansätze, pflanzliches Wachstum mathematisch zu beschreiben: neben linearen, gibt es exponentielle und sigmoide Modelle. Verfolgt man das Wachstum einer Pflanze über einen längeren Zeitraum, ist in der Regel ein sigmoider Wachstumsverlauf zu beobachten.

Die wichtigsten, noch heute angewandten Wachstumsmodelle, wurden im 19. Jahrhundert erstmals beschrieben von B. Gompertz, einem englischen Mathematiker, der durch seine Arbeiten im Bereich der Populationsdynamik bekannt wurde, und P.F. Verhulst, einem belgischen Mathematiker, der 1838 das logistische Modell des Bevölkerungswachstums veröffentlichte. Die klassischen Wachstumsmodelle erlauben nur die Modellierung eines Sättigungs- und sigmoidalen Wachstums.

Gompertzsche Wachstumsfunktion

Das Gompertzsche Wachstumsmodell ist eine Erweiterung des demographischen Modells von T.R. Malthus, welches exponentielles Wachstum beschreibt. Gompertz fügte eine mit steigendem Alter exponentiell steigende Sterblichkeitsrate des Individuums einer Population ein. Die Funktion wird beschrieben durch:

$$\frac{dN}{dt} = -rN(t) \log \frac{N(t)}{K} \quad (1.2)$$

$N(t)$ bezeichnet die Anzahl der Individuen zum Zeitpunkt t , r ist die intrinsische Wachstumsrate, K ist die Kapazitätsgrenze. Die Gompertz-Gleichung beschreibt asymmetrisch-sigmoide Wachstumsverläufe.

Logistische Gleichung

Verhulst veröffentlichte dieses Modell 1838, um das selbst-limitierende Wachstum einer biologischen Population zu beschreiben. Das Anfangsstadium des Wachstums ist näherungsweise exponentiell, wird dann jedoch durch Konkurrenz oder limitierte Ressourcen verlangsamt und kommt schließlich zu einem Stillstand.

Das logistische Modell setzt zwei wesentliche Annahmen voraus:

1. bei optimalen Bedingungen ist das Wachstum proportional zur Größe der Population
2. das Wachstum ist proportional zu den verfügbaren Ressourcen

Beschrieben wird dieses Modell durch die Differentialgleichung:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t)}{K}\right) \quad (1.3)$$

$N(t)$ bezeichnet die Anzahl der Individuen zum Zeitpunkt t , r ist die Wachstumsrate, K die Kapazität. Eine allgemeine Lösung dieser Differentialgleichung

ist eine logistische Funktion:

$$N(t) = \frac{KN(0)e^{rt}}{K + N(0)(e^{rt} - 1)} \quad (1.4)$$

Dabei bezeichnet $N(0)$ die Startpopulation. Es gilt: $\lim_{t \rightarrow \infty} N(t) = K$. Mit logistischen Wachstumsfunktionen lassen sich symmetrisch-sigmoide Wachstumsverläufe darstellen [Erickson, 1976]. Bertalanffy [Bertalanffy, 1960] misst der Funktion Bedeutung für Approximationen des Wachstums höherer Pflanzen bei.

Diese Gleichungen beschreiben Wachstumsverläufe, erklären sie jedoch nicht im Detail. Bis jetzt gibt es noch kein allgemeingültiges Modell für den komplexen Prozess Wachstum. Jedoch ist es möglich mit Hilfe von Differentialgleichungen (DGL) Wachstumsdynamiken zu beschreiben und Informationen zu gewinnen. In diesem Sinne wurden die verschiedenen Kurvenanpassungen dazu genutzt, um Unterschiede im Wachstums- und Keimungsverhalten der Wildtypen und transgenen Pflanzen zu erkennen und quantifizieren zu können. Alle Kurvenanpassungen, mit Ausnahme der A/C_i -Kurven, wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot, 7.0, SystatInc., San Jose, California, USA durchgeführt.

1.4.3 Hinweise einer Beteiligung von Aquaporinen am Expansionswachstum

Die Expression von Aquaporinen gerade in Geweben starken Expansionswachstums, deutet auf eine Beteiligung von Aquaporinen an Wachstumsvorgängen hin. So ist das AthPIP1-2 stark in den wachsenden Zellen der Wurzel von *A.thaliana* exprimiert [Kaldenhoff et al., 1995]. AthTIP1-1 wird ebenfalls zeitgleich während der Elongation der Wurzelspitze exprimiert [Ludevid et al., 1992] und in den Infloreszenzinternodien [Hanzwa et al., 1997]. RsTIP1 aus *Raphanus sativa* ist während der Elongation des Hypokotyls exprimiert. Ähnliches wurde auch für *Ricinus communis* beobachtet [Eisenbarth and Weig, 2005].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von PIP1 und PIP2 Proteinen auf die Dynamik des Blattwachstums zu untersuchen. Da Aquaporine sehr häufig in meristematischen Geweben exprimiert werden, scheint eine Beteiligung von Aquaporinen bei der Regulierung des Wassertransportes, wie er bei dem Expansionswachstum der Zellen vonnöten ist, wahrscheinlich. Mit Hilfe verschiedener transgener Pflanzen sollte genauer analysiert werden, welche Auswirkungen ein Ausschalten dieser Proteine auf das Blattwachstumsverhalten von *N.tabacum* und *A.thaliana* hat. Dabei standen zum einen RNAi-Pflanzen von *N.tabacum* zur Verfügung, bei welchen die Expression des NtAQP1, oder des NtAQP2 unterdrückt war, zum anderen zwei T-DNA Insertionsmutanten von *A.thaliana*.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Pflanzen und Anzuchtbedingungen

2.1.1 Versuchspflanzen

Zwei verschiedene Organismen wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht: *Nicotiana tabacum* (L.) (Virginischer Tabak) und *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Ackerschmalwand).

***Nicotiana tabacum* (L.)**

Nicotiana tabacum ist eine einjährige Pflanze mit wechselständig angeordneten Blättern und gehört zur Familie der Solanaceae. Das Alkaloid Nicotin wird in den Wurzeln gebildet und in den Blättern eingelagert. Tabak wurde wahrscheinlich schon in prä-columbianischer Zeit in Mittel- und Südamerika kultiviert.

Um Informationen darüber zu erhalten, ob PIP Proteine einen Einfluss auf das Blattwachstum ausüben, wurden Wachstumsdynamiken des Wildtyps (*N. tabacum* cv. Petit Havana SR1) sowie zweier transgener Linien (NtAQP1 und NtAQP2) miteinander verglichen. Die Akkumulation der PIP1 oder PIP2 Proteine war durch RNAi-Technik unterdrückt. Bei den in dieser Arbeit mit RNAi-PIP1 bezeichneten Pflanzen war die Akkumulation der PIP1-Proteine unterdrückt, bei den mit RNAi-PIP2 bezeichneten Pflanzen entsprechend die Akkumulation der PIP2-Proteine. Die Pflanzen wurden von M. Bots hergestellt und charakterisiert [Bots et al., 2005b]. Es wurde keine Selektion der transgenen Pflanzen über eine Kanamyzin-Resistenz vorgenommen, da Kanamycin eine Wachstumsverzögerung bewirkt. Statt dessen wurde am Ende der Versuche Blattmaterial entnommen und eine PCR (Polymerase chain reaction) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die verwendeten Pflanzen transgen waren (siehe Kapitel 2.2).

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Arabidopsis thaliana ist eine krautige, einjährige Rosettenpflanze mit grundständigen Blättern aus der Familie der Brassicaceae. Ursprünglich war die Ackerschmalwand im Mittelmeergebiet heimisch, heute umfasst das Verbreitungsgebiet fast ganz Mitteleuropa. *A. thaliana* gehört zur Ruderalflora und ist seit den

1940er Jahren einer der wichtigsten Modellorganismen der Genetik.

Die Wachstumsuntersuchungen wurden an zwei T-DNA Insertionsmutanten von *A.thaliana* Ökotyp Columbia (Col 0), durchgeführt. Die im Folgenden mit TI-PIP1;2 bezeichnete Insertionsmutante (N645347, NASC, N, Nottingham Arabidopsis Stock Center) besitzt eine Insertion nach Basenpaar 769 im Intron, und TEPIP1;2 (N519794) eine Insertion im dahinterliegenden Exon nach Basenpaar 867. Die Insertion der T-DNA im 2. Exon inhibiert die Transkription der mRNA von AtPIP1;2 und bewirkt so dessen knock-out [Siegfart, 2007]. Dagegen zeigt die Introninsertion eine zum WT unveränderte Expression des AtPIP1;2 und wurde deswegen im Folgenden als Kontrolle benutzt.

2.1.2 Pflanzenanzucht

N.tabacum - Gewächshaus

Samen des Wildtyps und der transgenen Pflanzen (RNAi-PIP1) wurden in Erde des Typs ED 73 (Einheitserde, Balster Einheitswerk, Fröndenberg; N: 250 mg l^{-1} , P_2O_5 : 300 mg l^{-1} , K_2O : 400 mg l^{-1}), der Sand beigemischt war (Mischungsverhältnis ca. 3:1), ausgesät und nach 7 bzw. 14 Tagen in größere Gefäße umgetopft (9 cm x 9 cm, bzw. 24 cm x 24 cm). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus PhyTec des FZJ. Die mittlere Lichtintensität am Mittag betrug ca. 700 $\mu\text{mol } m^{-2}s^{-1}$ PPFD (16 h / 8 h, Licht/Dunkel) und erreichte Maximalwerte von ca. 1200 $\mu\text{mol } m^{-2}s^{-1}$ PPFD an sehr sonnigen Tagen (April - Mai). An bedeckten Tagen und bei einer Beleuchtungsstärke unter 20.000 Lux, wurde eine künstliche Zusatzbeleuchtung (Na-Hochdruckdampflampen, Philips, IP65) eingeschaltet. Die Temperaturen lagen bei 25°C/18°C (Tag/ Nacht), und die relative Luftfeuchte betrug ca. 60%.

Für die DISP-Messungen (Digital Image Sequence Processing Method) wurden Tabakpflanzen (WT, RNAi-PIP1) kontinuierlich angezogen, d.h. über einen Zeitraum von drei Monaten (Juli bis August 2005) wurden alle zwei Wochen neue Samen ausgesät. So war gesichert, dass in einem Zeitraum von jeweils zwei Wochen 8-10 Pflanzen des gleichen Entwicklungsstadiums für die Einzelblattmessungen des Wachstums zur Verfügung standen.

N.tabacum - Klimakammer

Samen des Wildtyps und der transgenen Pflanzen (RNAi-PIP1 und RNAi-PIP2) wurden in einem Erde - Sandgemisch (siehe oben) angezogen. Die Temperatur in der Kammer betrug tags 24°C, nachts 18°C, die relative Luftfeuchte lag bei 50 bis 60%. Die Lichtperiode dauerte 12 h an, die Beleuchtung erfolgte über Na-Hochdruckdampflampen (Master, SON-T, PIA, Green Power, 400 W, Philips) und HQI-Lampen (Master, HQI-T Plus, 400 W, Philips). Die Lichtintensität auf der Höhe der Pflanzen betrug zwischen 1000 und 1400 $\mu\text{mol } m^{-2}s^{-1}$.

A.thaliana - Arabidopsenkammer

Samen der beiden *A.thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten, TIPIP1;2 und TEPIP1;2, wurden in Erde des Typs P (Einheitserde, Werkverband Sinntal-Jossa; N: 50-300 mg l^{-1} , P_2O_5 : 80-300 mg l^{-1} , K_2O : 80-400 l^{-1}) in Multitopfpaletten ausgesät. Dabei wurden zwischen 4 und 6 Samen in jede Aussparung gelegt.

Abbildung 2.1: *N.tabacum* Wildtyp und transgene Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) - fünf Wochen nach der Keimung. Anzucht in der Klimakammer.



Anschließend wurden die Samen für 2.5 bis 4 Tage bei 4°C in eine Kühlkammer gestellt.

Die Pflanzen wuchsen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht / 16 h Dunkel) in einer klimatisierten Kammer heran (24°C tags / 18°C nachts, relative Luftfeuchte 50 bis 60%). Die Lichtintensität in der Kammer lag bei $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD (Fa. Osram, Fluora L36W/77). Zwei Tage nach der Keimung wurden die Pflänzchen in den Multitopfpaletten vereinzelt und nach 27 Tagen in größere Töpfe (9 cm x 9 cm) umgetopft.



(a) TIPIP1;2



(b) TEPIP1;2

Abbildung 2.2: *A.thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten (TIPIP1;2 und TEPIP1;2) - vier Wochen nach der Keimung.

2.2 Nachweis der transgenen DNA

Eine Selektion der transgenen Tabakpflanzen erfolgte wie bereits oben ausgeführt nach Beendigung der Wachstumsanalysen mit Hilfe einer PCR (Polymerase chain reaction).

2.2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde nach einem Protokoll von Edwards [Edwards et al., 1991] durchgeführt und ermöglicht eine schnelle Präparation der genomischen DNA in PCR-Qualität.

Extraktionsmedium (autoklaviert):

- 200 mM Tris/HCL, pH 7,5
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- SDS

KAc, Kaliumacetat, 3 M, pH 6 (autoklaviert)

Pro Pflanze wurde je eine Blattscheibe in einem 1.5 ml Eppendorf Gefäß mit 400 μ l Extraktionspuffer versetzt und zerrieben. Nach Zugabe von 150 μ l KAc wurde das Gemisch für 2 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und 500 μ l Isopropanol zugegeben. Anschließend wurde 2 min bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Reinigen der DNA, die als Pellet am Boden bleibt, wurde mehrmals hintereinander 1 ml 80% EtOH zugegeben und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 40 μ l H_2O gelöst und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 PCR-Analyse

Folgender Standardreaktionsansatz für ein Endvolumen von 25 μ l wurde verwendet:

- 2,5 μ l 10x PCR Puffer (Buff Taq- $MgCl_2$) (Fermentas)
- 2,5 μ l 2 mM dNTP Mix (Fermentas)
- 0,5 μ l Primer frw. (10 pmol/ μ l)
- 0,5 μ l Primer rev. (10 pmol/ μ l)
- 2 μ l 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas)
- 0,5 μ l Taq-Polymerase (Fermentas)
- 0,5 μ l genomische DNA
- 16 μ l H_2O

Die Amplifizierungen erfolgten in einem Thermal-Cycler (Bio-Rad, USA). In Tab. 2.1 finden sich die Inkubationszeiten und -temperaturen des Programms. Die Anzahl der Reaktionszyklen, die Elongationszeiten und die Hybridtemperaturen wurden an die spezifischen Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotide angepasst. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tab. 2.2 aufgelistet. Die PCR-Ansätze wurden nach der Reaktion mit 5 μ l Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die amplifizierten PCR-Produkte konnten dann auf einem UV-Tisch fotografiert werden.

Tabelle 2.1: Programm der Standard-PCR

Zyklus	Dauer	Temperatur	Funktion
1 (1x)	4 min.	95°C	Denaturierung
2 (35x)	30 sec.	95°C	Denaturierung
	30 sec.	50°C – 58°C	Primer Hybridisierung
	30 sec.	72°C	Primer Verlängerung
3 (1x)	5 min.	72°C	Primer Verlängerung
4 (1x)	∞	4°C	

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide. Die Oligonukleotide sind in 5' \rightarrow 3' Orientierung angegeben.

Primer	Sequenz	T_m
35S-Prom FWD	ATA AGG AAG TTC ATT TCA TTT GGA	54,2°C
GSP-PIP1 REV1	CCA AAA TAG GAA CAT GTG AAT CTC	57,6°C
GSP-PIP2 REV2	CAA AAC AGG GAC ATG GGA GTC ACG	64,4°C
5NTPAL FWD	CTT GTC CTA CAT TGC CGG T	56,7°C
3NTPAL REV	TCA TCT TGG TTG CAG AAC GG	57,3°C

2.3 Analyse des Blattwachstums

Die Gesamtblattflächen der Tabakpflanzen wurden zum einen mit Hilfe eines automatischen Screening-Systems (Growscreen), zum anderen mit Hilfe eines Lineals bestimmt. Einige Einzelblattmessungen mit Hilfe der DISP-Methode wurden ebenfalls gemacht. Die *A.thaliana*-Pflanzen wurden ebenfalls solange mit dem Growscreen vermessen, bis sie für diesen Aufbau zu groß waren. Anschließend wurden die Blätter eines Teils der Pflanzen geerntet und die Blattflächen, mit einer Auflösung von 150 dpi, gescannt. Die Gesamtblattflächen in Pixel wurden anschließend mit Hilfe des Programms Photoshop (Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems Incorporated) berechnet.

2.3.1 Definition von Wachstumsraten

absolute Wachstumsrate

Die absolute Wachstumsrate $\frac{dX}{dt}$ gibt die Zunahme der Größe X während einer bestimmten Zeit an. X kann dabei ein Volumen, eine Masse, oder Länge bezeichnen.

relative Wachstumsrate

Die relative Wachstumsrate $\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ gibt an, um welchen Bruchteil von X die Größe X während einer bestimmten Zeit zugenommen hat. Bei der Berechnung der relativen Wachstumsrate (relative growth rate, RGR) wird eine exponentielle Blattflächenentwicklung angenommen.

Die *RGR* ist definiert als:

$$RGR = \frac{1}{A_B} \frac{dA_B}{dt} \quad (2.1)$$

durch Integration dieser Gleichung erhält man:

$$RGR(\%d^{-1}) = \frac{100}{\Delta t} \ln \frac{A_{t2}}{A_{t1}} \quad (2.2)$$

wobei A_{t1} und A_{t2} die Blattflächen zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 sind [Walter and Schurr, 1999], d.h. die RGR ist relativ zum aktuellen Flächenwert¹. Die RGR wurde in dieser Arbeit als %/Zeiteinheit angegeben.

2.3.2 Messung der Blattflächen mit dem Lineal

Die Fläche eines einzelnen Blattes berechnet sich nach der Formel:

$$A_{Blatt} = L * B * 0.75 \quad (2.3)$$

L bezeichnet die Länge des Blattes, B die Breite, die an der breitesten Stelle des Blattes bestimmt wurde und 0.75 ist der Formfaktor. Der Formfaktor ergibt sich aus dem biometrischen Verhältnis zwischen dem Produkt aus der Länge und Breite des Blattes und der tatsächlichen Blattfläche in Papiermasse. Zunächst wird die Länge und Breite des Blattes bestimmt, das Blatt kopiert und die Kopie des Blattes auf einer Laborwaage gewogen. Über die Masse der Blattkopie und die Dichte des Papiers ($\frac{mg}{cm^3}$), läßt sich die Fläche des Blattes errechnen. Trägt man diese Fläche gegen das Produkt aus Länge und Breite des Blattes auf, so ergibt sich der Formfaktor des Blattes aus der Steigung der Regressionsgeraden dieser Punkte. Für *N.tabacum* ergibt sich ein Wert von 0.75. Dieser Faktor konnte mit einer Genauigkeit von 5 % für den gesamten Bereich der Blattentwicklung benutzt werden [Walter and Schurr, 1999], [Walter, 1997]. Der systematische Fehler der Linealmessung der Gesamtblattfläche beträgt unter 5 % und wurde mittels einer Gausschen Fehlerfortpflanzung für die Gesamtblattfläche von 28. Tage alten Tabakpflanzen ausgerechnet (für eine

¹D.h. ein exponentielles absolutes Wachstum würde ein lineares relatives Wachstum ergeben

Gesamtblattfläche von z.B. 61 cm^2 ergibt sich ein Fehler von $\pm 1.8 \text{ cm}^2$).

Länge und Breite der Blätter wurden mit einem Lineal vermessen. Anschließend wurde die Gesamtblattfläche $BF_{ges.}$ und die relative Wachstumsrate (relative growth rate - RGR) berechnet (siehe oben).

2.3.3 Nummerierung der Blattpositionen des Tabaks

In dieser Arbeit wurden die Tabakblätter von den Keimblättern ausgehend nummeriert; also von unten nach oben. Die Keimblätter sind demnach Blatt 1 und 2, Blatt 3 das erste Folgeblatt usw.

2.3.4 Bestimmung der Blattflächen mit Hilfe des automatischen Screeningsystems - Growscreen

Die zeitliche Entwicklung der Gesamtblattflächen der Tabak-, und *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde mit dem automatischen Screeningsystem Growscreen verfolgt (siehe auch [Walter et al., 2007]).

Set up

Der Aufbau (siehe Abb. 2.4) bestand im wesentlichen aus einer Farb-CCD-Kamera (Scorpion IEEE 1394, Fa. Point Grey, Vancouver, Kanada, 1280 x 960 pixel) mit einem 25 mm Objektiv (Fa. Cosmicar/Pentax, Hamburg), die an zwei Verschiebetischen (Pico-Maxi, Type FMD-LPT 80.550.1205-SM, Laser 2000 GmbH, München) befestigt war. Verschiedene Kamerapositionen liessen sich über die verwendete Software ansteuern. Der Abstand zwischen Pflanzen und Kamera betrug ca. 50 cm. Mit diesem Aufbau war es möglich, Pflanzen bis zu einem Durchmesser von ca. 12 cm aufzunehmen, dann waren die Blätter zu groß und ragten aus dem Bild der Kamera. Die Pflanzen wurden während der Bildaufnahme über einen Ring aus Cluster-LEDs (Weißlicht, 24 V, Fa. Signal Construct GmbH, Niefern) beleuchtet. Pro Aufnahme wurden ca. zehn Sekunden benötigt, da jeweils zehn Bilder aufsummiert wurden, um ein weniger verrauschtes Signal zu erzielen, und das Verfahren der Verschiebetische Zeit benötigte. Die Bilder wurden anschließend als Multitiff-Datei abgespeichert.

Funktionsweise des CCD-Sensors

Die lichtempfindlichen Zellen einer einzelnen Fotozelle auf dem Halbleiter des CCD-Sensors der Kamera können nur Helligkeitswerte erfassen. Um eine Farbinformation zu erhalten, sind Farbfilter vor jeder einzelnen Zelle notwendig (in den drei Grundfarben Rot - Grün - Blau). Die Anordnung dieser Farbfilter ist einem Schachbrett ähnlich: Rot- und Grünfilter wechseln sich in den ungeraden Zeilen ab und Grün - Blau Filter in den geraden Zeilen. Der Farbfilter besteht also zu 50% aus Grünfiltern und zu je 25% aus Rot- und Blaufiltern (Bayer Pattern). Jeder Farbpunkt (pixel) liefert nur Informationen für eine einzige Farbkomponente an dieser Stelle. Für eine vollständige Farbinformation müssen die jeweils benachbarten Pixel derselben Farbe zur Farbinterpolation herangezogen werden.

An jedem Farbpixel fehlen also $\frac{2}{3}$ der Farbinformation. Verschiedene Algorithmen der Kamerahersteller können verwendet werden, um ein vollständiges Set von Rot-Grün-Blau Werten an jedem Punkt zu interpolieren.

Umwandlung der RGB- in HSV-Daten

Die so erhaltenen RGB-Daten werden in eine andere Darstellung transformiert (siehe auch [Walter et al., 2007]). Dies hat den Vorteil, dass eine Farbsegmentierung der Daten, über eine Festlegung von Schwellenwerten der Parameter, leichter erfolgen kann. Die Farbe wird im HSV-Raum über den Farbton, die Sättigung und den Grauwert definiert (Hue/Saturation/Value = Farbton/Sättigung/value= $\max(r,g,b)$). Der HSV-Farbraum lässt sich als Zylinder oder Kegel darstellen. Im RGB-Raum wird eine Farbe durch einen Rot-, Grün- und einen Blauanteil beschrieben. Die Festlegung der Schwellenwerte für die Farbsegmentierung anhand der HSV-Werte ist für das menschliche Auge, bzw. Gehirn, wesentlich einfacher, als über die Rot-, Blau-, und Grünanteile der Farben. Die Segmentierung erfolgte mit dem Programm Bayer2area. Typische Schwellenwerte der Parameter für *A.thaliana* finden sich im Anhang. Die Festlegung der Schwellenwerte hängt ab von der Pigmentzusammensetzung der Pflanzen, dem Bodentyp, und der Oberflächenstruktur der Blätter und muss für jede Pflanzenart, bzw. Bodentyp, neu festgelegt werden. Neben den Originalbildern, die in einer Multitiff-Datei abgespeichert werden, werden noch die farbcodierten Bilder nach der Segmentierung in einer -masked Datei ausgegeben. Die segmentierten Blattflächen jeder Pflanze (in pixeln) werden anschließend in eine Textdatei geschrieben. Aus diesen Werten lässt sich im folgenden die Gesamtblattfläche ($BF_{ges.}$) ermitteln.

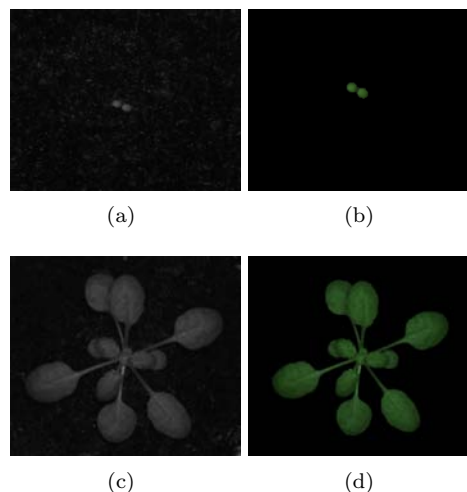


Abbildung 2.3: *A.thaliana* T-DNA-Insertionsmutante TIPIP1;2: zwei Tage nach der Keimung (a,b) und 24 Tage nach der Keimung (c,d).
a,c – Originalbild, b,d – farbcodiertes Bild nach der Segmentierung.

2.3.5 Digitale Bildsequenz-Analyse

Mit Hilfe der digitalen Bildsequenz-Analyse (auch als DISP-Methode bezeichnet: Digital Image Sequenz Processing Method) ist es möglich, das Wachstum eines einzelnen Blattes mit einer sehr hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu analysieren und somit den Tagesgang des Blattwachstums aufzulösen.

Aufbau und Aufnahmebedingungen

Bei der DISP-Messung wird das Blatt mittels Gewichten (12 g) an einem Drahtrahmen fixiert, um epinastische Bewegungen des Blattes während der Bildaufnahme zu verhindern (siehe Abb. 2.5). Speziell für die Tabakblätter wurden fünf Gewichte verwandt, eines an der Blattspitze und vier an der Seite des Blattes. Die 12 g-Gewichte und deren Anordnung in dieser Weise, führen dazu, dass der Wachstumstagesgang (zeitliche Variation der Wachstumsaktivität während 24 Stunden) und der Basis-Spitze-Gradient (räumliche Verteilung der Wachstumsaktivität auf der Blattspreite) vergleichbar zu den Mustern frei wachsender Blätter sind [Walter et al., 2000]. Die Bildaufnahme erfolgte über eine CCD-Kamera (Sony XC-75, bzw. Sony XC-55) mit einem 12 mm Objektiv, die senkrecht zur Blattebene befestigt war. Da Aufnahmen über 48 Stunden gemacht wurden, musste das Blatt nachts beleuchtet werden; dies passierte mittels IR-LEDs, die im nahen Infrarotbereich (λ 940 nm) strahlen und das Pflanzenwachstum nicht beeinträchtigen [Schmundt et al., 1998]. Die Distanz zwischen Kamera und Blatt betrug zwischen 20 und 30 cm. Die Länge einer Bildsequenz betrug jeweils 48 Stunden; dabei wurden in einem Abstand von zwei Minuten Bilder aufgenommen.

Die Aufnahmen wurden in einem klimatisierten Anzuchttraum gemacht, da Aufnahmen direkt im Gewächshaus wegen der wechselnden Beleuchtung schwierig sind. Die Temperatur im Anzuchttraum betrug 23 °C tags und 18 °C nachts, die relative Feuchtigkeit circa 50 %, die Lichtintensität der Leuchtröhren 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Osram, cool white, L36W, 21-840) und der Lichtrythmus war auf 12 h / 12 h eingestellt. Damit die Pflanzen sich an diese Bedingungen gewöhnen konnten, wurden die Messungen erst nach 3-4 Tagen gestartet, wenn die Pflanzen sich akklimatisiert hatten. Es wurden jeweils Blätter zweier Pflanzen (WT und RNAi-PIP1) gleichzeitig, d.h. in zwei Aufbauten nebeneinander, aufgenommen. Dabei wurden die Blattpositionen 10, 11 und 12 analysiert.

Bildanalyse

Grauwertkontraste auf der Blattoberfläche können von der CCD Kamera gut erkannt werden. Aus der zeitlichen Änderung der Grauwertstrukturen einer Bildsequenz können die Geschwindigkeiten einzelner Bildpunkte mit dem Strukturtensor-Verfahren bestimmt werden [Bigün and Granlund, 1987, Christ, 2005]. Bei der Berechnung der räumlich-zeitlichen Verteilung der Wachstumsraten werden zunächst Vektorfelder von Verschiebungsvektoren bestimmt; dabei wird jedem Pixel in jedem Bild der Sequenz eine Geschwindigkeit (der Verschiebung) zugeordnet. Um diese Verschiebungsvektoren zu bestimmen wird der gesamte Bilderstapel in Würfel von z.B. 7 x 7 x 7 Pixeln (x- und y-Richtung sowie Zeitachse), unterteilt. Die Grauwertverteilung innerhalb dieser Würfel wird mit Hilfe eines Strukturensors bestimmt [Bigün and Granlund, 1987]. Grauwertgradienten werden erkannt und ein Vektor, der senkrecht zu all den Vektoren

dieser Gradienten ist, wird angefitet. Die Komponenten dieses Vektors werden dann einem zentralen Pixel dieses Würfels zugeordnet und damit ist ein Element des Vektorfeldes aus Verschiebungsvektoren berechnet. Diese Berechnung wird für die benachbarten Pixel wiederholt, indem der Würfel zum benachbarten Pixel verschoben wird. Aus diesen Vektorfeldern werden dann in einem nächsten Schritt „Divergenzfelder“ berechnet. Die Divergenz ist die Summe der Ableitungen des Vektorfeldes in x- und y-Richtung. Die lokale Änderung des Vektorfeldes wird darüber bestimmt. Die Größenordnung der Divergenz ist equivalent zur lokalen Wachstumsrate. Die pixelweise berechneten Wachstumsraten werden anschließend geglättet und in ein natürliches Koordinatensystem, z.B. die Blattadern, transformiert.

Auswertung

Mit Hilfe der DISP-Methode gewinnt man entweder eine hohe zeitliche oder räumliche Auflösung. Die Auswertung erfolgt in zwei Schritten: zunächst werden die Pixelgeschwindigkeiten ermittelt (und/oder die RGR), dann in einem zweiten Schritt, die RGR einer bestimmten Fläche (AOI: Area of Interest) auf dem Blatt. Die Bestimmung der regularisierten Pixelgeschwindigkeiten in x- und y-Richtung wird auf einem Cluster gerechnet. Damit die Berechnung optimale Ergebnisse liefert, müssen verschiedene Parameter für jede Bildsequenz angepasst werden. In Anhang B findet sich ein Beispiel einer Parameterdatei für Tabak.

tau Strukturtensor Parameter, definiert den Schwellenwert des kleinsten Eigenwertes

noise Strukturtensor-Parameter, der mit tau verknüpft ist und die Güte (Signal-Rausch-Verhältnis) der Schwellenwert-Berechnung angibt.

pyrstufe Pyramidenstufe mit der die Daten analysiert werden sollen (0 = alle Daten, 1 = Bildlänge und -breite wird halbiert und damit die Bildgröße auf ein Viertel reduziert. So wird die Rechenzeit verkürzt, damit aber auch die Auflösung reduziert

threshold Schwellenwert der Grauwerte für die Maske; bestimmt die Abtrennung des Hintergrundes vom Blatt

b-rec-x und b-rec-y rekursive Filterwerte für die Regularisierung in x-, und y-Richtung

viter Anzahl der Iterationen des iterativen Filters

viter-rec Anzahl der Iterationen des rekursiven Filters

vsmooth Glättungsparameter für die Regularisierung; kleine Werte stehen für eine geringe Glättung

Folgende Dateien werden ausgegeben:

- **rank** - anhand des Ranges lässt sich abschätzen, ob die Parameter gut angepasst wurden. Der Rang kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen. Rang 0 bedeutet, dass keine Information vorhanden ist, Rang 1, dass mehr als ein Eigenwert Null ist, Rang 2, dass exakt ein Eigenwert des Strukturtensor Null ist und das ist genau das, was benötigt wird, Rang 3 zeigt an, dass das Modell nicht gültig ist. Es ist also notwendig, die Parameter so anzupassen, dass ein Rang von 2 erreicht wird.

- regularisierte Geschwindigkeiten in x- und y-Richtung

Die Bestimmung der durchschnittlichen RGR einer bestimmten Blattfläche (AOI) lässt sich mit dem Programm Growflow bestimmen. Nachdem man eine AOI auf dem Blatt ausgewählt hat, wird die durchschnittliche RGR dieser Fläche für jeden Zeitpunkt gespeichert und als rgr.txt file gespeichert. Dort ist für jeden Datenpunkt die RGR als %/Bild angegeben. Dies muss noch in die reale Zeit umgerechnet werden. Damit ist es dann möglich für diesen Flächenausschnitt den zeitlichen Verlauf der RGR über einen Zeitraum von Minuten bis Tagen zu verfolgen.

Die erhaltenen RGR-Werte werden in dieser Arbeit sowohl als Stundenmittelwerte ($\%/h^{-1}$) oder als normierte Werte dargestellt. Mit den normierten Werten lassen sich verschiedene Tagesgänge besser miteinander vergleichen. Man bildet zunächst den Tagesmittelwert der RGR über 24 Stunden und dividiert anschliessend die einzelnen Stundenmittelwerte der RGR durch diesen Tagesmittelwert, bezieht also die Stundenmittelwerte auf das Tagesmittel

$$RGR_{norm} = \frac{\text{Stundenmittelwerte}}{\text{Tagesmittelwert}} * 100$$

Liegen Daten mehrerer Tage vor, werden die auf das Tagesmittel bezogen Stundenmittel noch gemittelt.

2.4 Biomassebestimmung

Es wurde jeweils die gesamte Blattmasse der *A.thaliana*-Pflanzen geerntet und das Frischgewicht (FG) mit einer Analysewaage (Genauigkeit ± 0.01 g) bestimmt, die Blätter anschließend bei $80^{\circ}C$ ca. 2 Wochen im Trockenschrank getrocknet und das Trockengewicht bestimmt (TG). Der relative Wassergehalt (RWG) der Blätter in Prozent berechnet sich nach der Formel:

$$RWG = \frac{(FG - TG)}{FG} * 100 \quad (2.4)$$

wobei FG das Frischgewicht in g, und TG das Trockengewicht in g bezeichnen.

2.5 Photosynthesemessungen

2.5.1 Gaswechsellmessungen

Der Gaswechsel der Tabakblätter wurde mit einem tragbaren, offenen Gaswechsellmesssystem (LiCor 6400, LiCor, Lincoln, USA) gemessen. Für Lichtkurven wurde dabei eine geschlossene Blattkammer mit einer internen Lichtquelle (LiCor 6400-02B, Red-Blue Light Source) verwandt, für A/C_i Kurven eine Blattkammer mit einem PAM-2000 Adapter (LiCor 6400-06, PAM 2000 Adapter Chamber), da simultan auch die Chlorophyll a-Fluoreszenz der Blätter gemessen wurde. Die Lichtintensität konnte bei dieser Kammer nicht intern reguliert werden, daher wurde ambientes Licht genutzt.

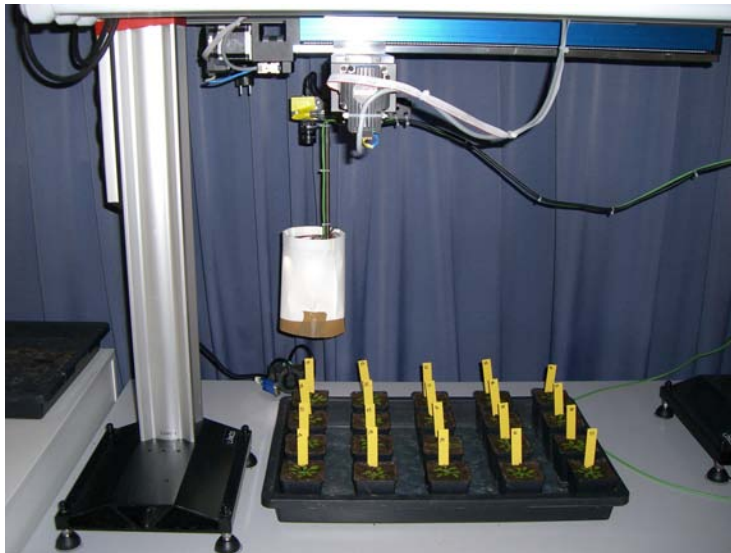


Abbildung 2.4:
Screening-
Aufbau mit
Farbkamera,
Beleuchtungs-
ring und
Verschiebe-
tischen.



Abbildung 2.5:
DISP-Aufbau
mit fixiertem
N. glauca-
Blatt, Bele-
uchtungsring,
Gewichten und
Metallring.

Um die Photorespiration zu vermindern, wurde für alle Messungen ein künstliches Luftgemisch aus N_2 und 2% O_2 verwendet. In der Blattkammer war für alle Messungen eine Blocktemperatur von 25°C, eine Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70% und ein Fluss von $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ eingestellt.

Für die Lichtkurven wurde die Nettophotosyntheserate bei zehn verschiedenen Lichtintensitäten gemessen. Die Pflanzen wurden zunächst schrittweise an eine maximale Lichtintensität von $1400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ angepasst. Die Intensitäten wurden dann stufenweise auf $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ verringert. In der Blattkammer war eine CO_2 -Konzentration von $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ eingestellt. Die Pflanzen waren während der Aufnahme der Lichtkurven zwischen 25 und 30 Tage alt (Tage nach der Keimung). Es wurden Blätter einer mittlere Blattposition (Blatt 7) ausgewählt und der Gaswechsel an der Blattspitze gemessen.

Die Messungen der Netto-Photosyntheseraten bei verschiedenen CO_2 -Konzentrationen wurden bei einer Lichtintensität durchgeführt ($700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), die knapp unter derjenigen der Lichtsättigung lag, um die Pflanzen einem möglichst geringen Stress auszusetzen. Die Blätter wurden schrittweise an eine maximale CO_2 -Konzentration von $1400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ angepasst. Von diesem Punkt aus wurde die Konzentration dann bis auf $50 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ verringert. Die Pflanzen waren während der Gaswechsellmessungen zwischen 35 und 39 Tage alt. Es wurden Source-Blätter einer mittleren Blattposition ausgewählt (das jeweils größte Blatt, neunte Blattposition) und Blätter einer unteren Blattposition (Blatt 7) und der Gaswechsel an der Blattspitze gemessen.



Abbildung 2.6: Kombinierte Gaswechsel- und Fluoreszenzmessung an einem Tabakblatt. Rechtes Bild: PAM-Adapter Blattkammer.

2.5.2 Fluoreszenzmessungen

Die Chlorophyll a-Fluoreszenz der Blätter wurde mit einem tragbaren Puls-Amplituden-modulierten Fluorometer (PAM-2100 Walz, Effeltrich) bestimmt. An dunkel-adaptierten Blättern wurde die potentielle (maximale) Quanteneffizienz des Photosystems II (F_v/F_m) berechnet, indem die minimale Fluoreszenz F_0 und die maximale Fluoreszenz F_m während eines lichtsättigenden Pulses gemessen wurde.

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

An Licht-adaptierten Blättern wurde mit Hilfe eines lichtsättigenden Pulses die Grundfluoreszenz F_s und die maximale Fluoreszenz $F_{m'}$ bestimmt und daraus die effektive Quanteneffizienz $\Delta F/F_{m'}$ und die Elektronentransportrate (ETR)

des PSII berechnet. Nach Genty [Genty et al., 1989] berechnet sich die effektive Quanteneffizienz (ϕ_{PSII}) als:

$$\Delta F/F_{m'} = \frac{(F_{m'} - F_s)}{F_{m'}} \quad (2.5)$$

und die Elektronentransportrate als:

$$ETR = \Delta F/F_{m'} * PPFD * 0.84 * 0.5 \quad (2.6)$$

wobei PPFD die photosynthetisch aktive Photonenflußdichte bezeichnet. Der Faktor 0.84, auch Reflexionsfaktor genannt, ist abhängig von den Oberflächeneigenschaften des Blattes: nur ein Teil des einfallenden Lichtes wird vom Blatt absorbiert. Unter der Annahme, dass sich die einfallenden Quanten auf beide Photosysteme gleich verteilen, erhält man den Faktor 0.5. Das nicht photochemische Quenching wurde berechnet als [Bilger and Björkman, 1990]:

$$NPQ = \frac{(F_m - F_{m'})}{F_{m'}} \quad (2.7)$$

Tabelle 2.3: Fluoreszenzparameter [Maxwell and Johnson, 2006]

Parameter	Definition
F_0	minimale Fluoreszenz dunkel-adaptierter Blätter
F_m	maximale Fluoreszenz dunkel-adaptierter Blätter
F_v	variable Fluoreszenz dunkel-adaptierter Blätter
F_v/F_m	potentielle Quanteneffizienz des PSII dunkel-adaptierter Blätter
F_s	Grundfluoreszenz
$F_{m'}$	maximale Fluoreszenz licht-adaptierter Blätter
ΔF	Variable Fluoreszenz licht-adaptierter Blätter
$\Delta F/F_{m'}$	effektive Quanteneffizienz licht-adaptierter Blätter
NPQ	nicht-photochemische Energielöschung

2.6 Keimungsversuche

Samen von *N.tabacum* (Wildtyp, RNAi-PIP1-, und RNAi-PIP2-Pflanzen) wurden in Petrischalen (8 cm Durchmesser) auf eine doppelte Lage sterilen Filterpapiers (MN 713 Machery-Nagel) in Reihen ausgelegt; pro Petrischale 40 Samen und 5 Petrischalen pro transgener Linie, bzw. der Wildtypen. Das Filterpapier wurde mit 4 ml steriler Nährlösung, 1/10 MS-Medium [Murashige and Skoog, 1962], pH=6.5, benetzt und die Petrischalen mit Parafilm umwickelt. Die Petrischalen wurden anschließend in einen klimatisierten Raum (23°C) mit kontinuierlichem Licht (150 $\mu m^{-2} s^{-1}$, Leuchtröhren Osram, cool white, L36W, 21-840) überführt und die Keimung unter einem Binokular verfolgt. Dabei lassen sich morphologisch zwei Ereignisse beobachten: die Testaruptur, erkennbar an dem länglichen Aufreißen der Testa über der Mikropyle, und die Endospermruptur, bei der die Keimwurzel das Endosperm durchbricht. Für die Auswertung wurden der zeitliche Verlauf dieser beiden Ereignisse als Anteil der Samen in der

einen oder anderen Phase gegenüber der Zeit aufgetragen und Kurven angepasst. Dabei wurde eine Anpassung einer sigmoiden Kurve nach Weibull vorgenommen [Brown and Mayer, 1988]. Diese eignet sich gut für eine mathematische Beschreibung einer raschen Änderung zwischen zwei Zuständen, wie dies bei der Keimung normalerweise der Fall ist.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Nachweis der transgenen DNA

In Abb. 3.1 ist exemplarisch ein Gel mit den amplifizierten PCR-Produkten gezeigt. Die Größe der PCR-Amplifikate wurde in Agarosegelen mit einem DNA-Größenstandard (1000 Basenpaare, Fermentas GeneRuler) verglichen; die Größe der transgenen PCR-Produkte lag bei ca. 450 Basenpaaren.

Kontrollen mit genomischer DNA aus nicht transformierten *N.tabacum* Pflanzen und Wasserkontrollen ohne DNA zeigten die Spezifität der Amplifikationen an. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich noch ein Teilfragment des Gens für die Phenylalaninammoniumlyase amplifiziert; bei einigen Proben störten offensichtlich Sekundärstoffe (Nikotin etc.) des Tabaks den Nachweis der DNA. In diesen Fällen fehlten die betreffenden Banden auf dem Gel sowohl für die transgene DNA, als auch für das Teilfragment der Phenylalaninammoniumlyase. Die PCR-Reaktionen mit genomischer DNA der RNAi-Pflanzen zeigten eine Amplifikation des erwarteten 450 Basenpaaren großen PCR-Produktes in 95 % der Fälle. Bei den restlichen 5 % fehlten häufig auch die Banden für das Teilfragment der Phenylalaninammoniumlyase. Pflanzen bei denen nicht sicher nachgewiesen werden konnte, dass sie transgen sind, wurden nicht mit in die Analyse einbezogen.

3.2 Fehlerabschätzung des Screeningverfahrens

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war es, eine Fehlerabschätzung des Screeningverfahrens vorzunehmen, indem Daten dieser Methode mit denen einer Linealmessungen verglichen wurden. Die Ergebnisse der Fehlerabschätzung werden den Ergebnissen der Hauptfragestellung der Arbeit vorangestellt, da die Verlässlichkeit der Screeningdaten die Voraussetzung einer Auswertung der Wachstumsdaten ist.

Die Gesamtblattfläche, die über den Growscreen ermittelt wird, ist die Projektion einer Blattfläche, die beeinflusst wird von der Überlappung und der Bewegung der Blätter im Tagesverlauf. *Wie wirkt sich nun diese Blattbewegung auf eine Messung der Gesamtblattfläche aus: gibt es eine systematische Bewegung der Blätter im Tagesverlauf? Und lässt sich eine Fehlerabschätzung für die mit*

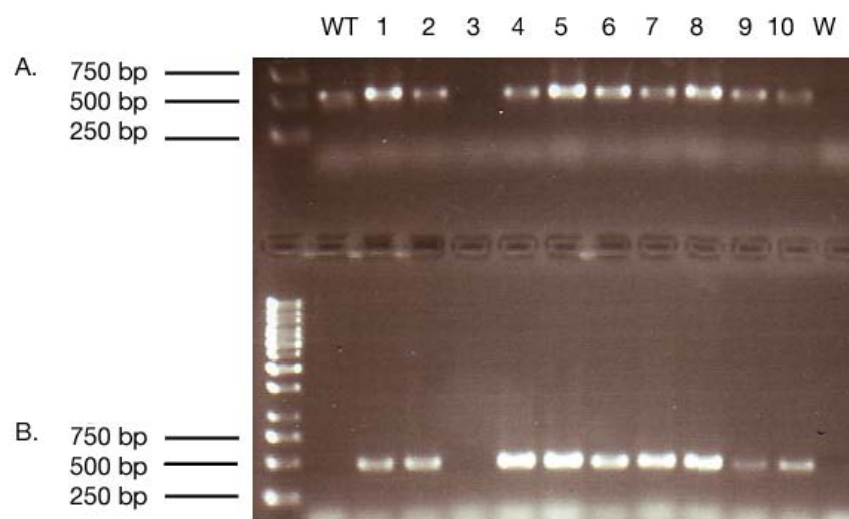


Abbildung 3.1: PCR-Analyse mit genomischer DNA aus den transgenen RNAi-Linien PIP1, PIP2 des Tabaks. A.) Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden 5NTPAL-for und 3NTPAL-rev. WT= Wildtyp, genomische DNA des untransformierten Wildtyps von *N.tabac.*, 1- 10 = genomische DNA der RNAi-PIP1-Pflanzen, W = Wasserkontrolle. B.) Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden 35S-Prom-for und GSP-PIP1-rev für die RNAi-PIP1-Linie, bzw. GSP-PIP2-rev für die RNAi-PIP2-Linie. WT = Wildtyp, 1- 10 = genomische DNA der RNAi-PIP1-Pflanzen, W = Wasserkontrolle.

dem Growscreen ermittelten Gesamtblattflächen vornehmen?

Um dies zu überprüfen wurden Screeningmessungen verschiedener Tageszeiten miteinander verglichen, sowohl bei *N.tabacum* als auch bei *A. thaliana*. Ein Vergleich zweier Messmethoden – Lineal- und Screeningmessungen – sollte eine ungefähre Fehlerabschätzung der Gesamtblattflächen der Screeningdaten ermöglichen, da bei den Linealmessungen die unterschiedlichen Anstellwinkel der Blätter keine Rolle spielen. Die gemessene Blattfläche ist mit dieser Methode also, im Rahmen der Messgenauigkeit, identisch mit der tatsächlichen Blattfläche. Deswegen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten – 11 Uhr und 15 Uhr desselben Tages – bei *N.tabacum*, sowohl Lineal- als auch Screeningmessungen durchgeführt und die Gesamtblattflächen und Wachstumsraten miteinander verglichen. Abb. 3.2 zeigt diesen Vergleich. Die Gesamtblattflächen der 11- und 15-Uhr Messungen wurden gegeneinander aufgetragen. Zum Zeitpunkt der Messungen waren die Tabakpflanzen 17 Tage alt. Mit dem Growscreen war es möglich je 54 Pflanzen pro Genotyp und Zeitpunkt zu messen, mit der Linealmessung lediglich sechs Pflanzen. Die Wachstumsraten (%/4h) ergeben sich aus den Steigungen (m) der Geraden:

$$\text{Wachstumsrate} = (m - 1) * 100$$

In Tab. 3.1 sind diese Wachstumsraten nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Wachstumsraten der Screening- vs. Linealmessung im Vergleich

<i>N.tabacum</i>	Wachstumsraten (%/4h) Screening	Wachstumsraten (%/4h) Linealmessung
WT	7.6	-4
RNAi-PIP1	11.4	21
RNAi-PIP2	12.8	-1

Aus einem Vergleich der Steigungen lässt sich eine erste Näherung eines systematischen Fehlers für die Wachstumsraten bestimmen. Betrachtet man die mit den Linealmessungen ermittelten Werte, so fällt auf, dass diese, bis auf die Werte der RNAi-PIP1 Pflanzen, wesentlich niedriger sind, als die Screeningdaten: mit -4 %/4h (WT) und -1 %/4h (RNAi-PIP2) wird kein Wachstum in dieser Zeit angezeigt. Die Screeningmethode ermittelt 7.6 %/4h (WT) und 12.8 %/4h (RNAi-PIP2). Damit ergibt sich ein systematischer Fehler der Gesamtblattfläche von ca. 10-13 %/4h für die Tabakpflanzen. Die höheren Wachstumsraten, die über den Growscreen ermittelt werden, liegen in der Bewegung der Blätter begründet: eine stärkere Steigung bedeutet eine weniger starke Überlappung, bzw. eine größere senkrechte Projektionsfläche der Blätter. Die Bewegung der Blätter wirkt sich also bei den über den Growscreen ermittelten Wachstumsraten stärker aus („virtuelles Wachstum“). Aus diesen Vergleichen ergibt sich, dass die Wachstumsraten, die durch den Growscreen ermittelt werden, keine Wachstumsraten im Sinne von Gl. 2.2 sind, sondern eine Funktion der Blattbewegung und des Zuwachses sind.

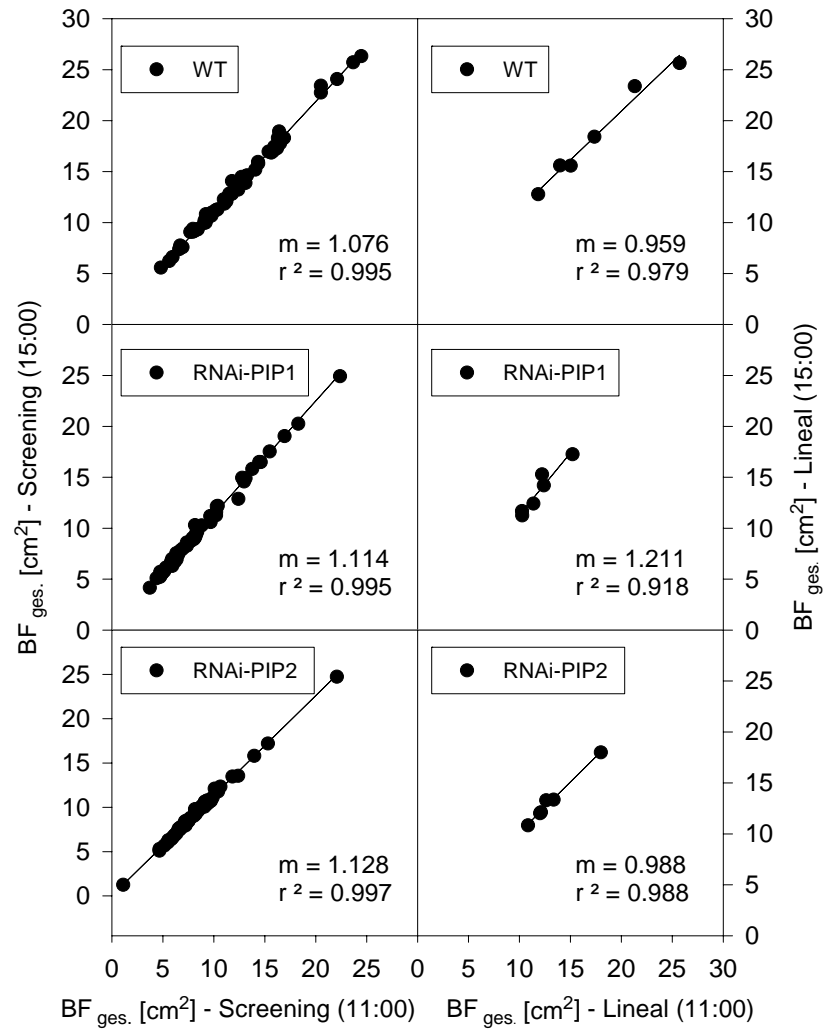


Abbildung 3.2: Vergleich zweier Messmethoden: Screening- vs. Linealmessung. Aufgetragen wurden die Werte der Blattflächen der 15 Uhr Messung gegen diejenigen der 11 Uhr Messung. Aus den Steigungen lassen sich die Wachstumsraten (%/4h) entnehmen. Vergleich der verschiedenen transgenen Linien des Tabak: (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) und WT ($n = 54$ für die Screeningmessungen und $n = 6$ für die Linealmessungen). Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt 17 Tage alt.

Wie stehen nun die Gesamtblattflächen, die über die beiden Methoden ermittelt werden, zueinander in Beziehung?

In Abb. 3.3 sind die Gesamtblattflächen der Lineal- gegen die der Screeningmessung aufgetragen (für zwei Zeitpunkte desselben Tages - 11 Uhr und 15 Uhr). Es ergibt sich für alle Pflanzen und beide Zeitpunkte eine lineare Beziehung, d.h. die Gesamtblattflächen sind einander proportional.

Die Blattbewegung im Tagesverlauf erfolgt systematisch, wie sich aus Abb. 3.4 schließen lässt. Hier ist für ein früheres Entwicklungsstadium der Tabakpflanzen (9 Tage nach der Keimung) zu drei verschiedenen Zeiten desselben Tages (9 Uhr, 11 Uhr und 15 Uhr) die Gesamtblattflächen mit Hilfe des Growscreen bestimmt und gegeneinander aufgetragen worden. Da aus Abb. 3.2 ersichtlich ist, dass die Wachstumsraten des Growscreens auch eine Funktion der Bewegung darstellen, und diese Steigungen linear sind, kann man schließen, dass die Blattbewegung innerhalb der Populationen systematisch im Tagesverlauf erfolgt. Die Blattbewegung der *A.thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten (TIPIP1;2, TEPIP1;2) scheint ebenso systematisch im Tagesverlauf zu erfolgen. Es wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten desselben Tages (9.30, 11.30 und 13.30 Uhr) Aufnahmen gemacht. Zu diesem Zeitpunkt waren die Pflanzen 16 Tage alt. In Tab. 3.2 sind die Steigungen der Abb. 3.5 zusammengefasst. Da keine vergleichenden Linealmessungen gemacht werden konnten, kann für diese Pflanzen leider keine Aussagen zum absoluten Fehler der Gesamtblattflächenbestimmung gemacht werden. Aus den linearen Steigungen lässt sich aber vermuten, dass auch *A.thaliana* eine systematische Blattbewegung zeigt. Im Verlauf des Vormittags liegen die Blätter der Rosette noch flach am Boden (siehe auch [Virnich, 2006]), zu Mittag und am Nachmittag dagegen stellen sie ihre Blätter steil auf, so dass die negativen Zuwachsraten aus dieser Blattbewegung resultieren. In dieser Zeit scheinen sich die beiden Insertionsmutanten gleich zu verhalten, anders als beim Tabak. Doch um dies genauer zu prüfen, hätten Linealmessungen durchgeführt, oder die Blätter eingescannt werden müssen.

Tabelle 3.2: Änderungen der Wachstumsraten im Tagesverlauf – Messungen um 9.30 Uhr, 11.30 Uhr, 13.30 Uhr. Die Wachstumsraten berechnen sich aus den Steigungen (m) der Geraden aus Abb. 3.5. T-DNA-Insertionsmutanten (TIPIP1;2, TEPIP1;2) von *A.thaliana* im Vergleich ($n = 54$).

Zuwachs- raten (2%/h)	TIPIP1;2	TEPIP1;2
zwischen 9.30 und 11.30	4%	1.8%
zwischen 11.30 und 13.30	-2%	-1%

Signifikanz der ermittelten Unterschiede

Mit Hilfe einer ANCOVA (Analysis of Covariance) ist es möglich zu überprüfen, ob sich Steigungen signifikant voneinander unterscheiden [Quinn and Keough,

2002]. Im Folgenden wurde zum einen geprüft, ob die Steigungen der mit verschiedenen Methoden ermittelten Daten signifikant voneinander unterschiedlich waren (Screeningmessung versus Linealmessung), zum anderen, ob die Steigungen zwischen den verschiedenen Pflanzenlinien (innerhalb einer Messmethode) unterschiedlich waren.

Die Wachstumsraten der Wildtyp- und RNAi-PIP2-Pflanzen unterschieden sich signifikant in Abhängigkeit der angewandten Messmethode: es ergab sich ein p -Wert < 0.01 ($\alpha = 0.05$, $n = 54$ für die Screeningmessung, $n = 6$ für die Handmessung). Für die RNAi-PIP1-Pflanzen liess sich dies nicht nachweisen, es ergab sich ein p -Wert > 0.05 ($\alpha = 0.05$, $n = 54$ für die Screeningmessung, $n = 6$ für die Handmessung). Allerdings läßt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden auch nicht eindeutig ausschliessen, denn der Wert der Stärke des Testes liegt unterhalb des geforderten Wertes von 0.8; für die etwas kleinere Differenz der Wachstumsraten (9.6 im Vergleich zu 11.6 und 13.8 bei den Wildtyp- und RNAi-PIP2-Pflanzen) wäre eine größere Anzahl Messungen nötig gewesen. Die Stärke eines Tests ist definiert als $1 - \beta$, wobei β der Fehler II Art ist. Die Stärke eines Tests wird beeinflusst von den Stichprobengrößen, der Anzahl der Gruppen, α , den Standardabweichungen der Proben und der Differenz der Gruppenmittelwerte und sollte zwischen 1 und 0.8 liegen. Die Stärke gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen Fehler zu finden, wenn er tatsächlich vorhanden ist. Ist also der Wert der Stärke sehr klein, ist die Wahrscheinlichkeit einen Unterschied zwischen den Proben zu finden, ebenfalls sehr gering. Eine Anzahl von 24, bzw. 25 Pflanzen reichte hier nicht aus, um einen Effekt nachzuweisen.

Die Wachstumsraten die über das Screeningverfahren ermittelt wurden, waren zwischen den Pflanzen signifikant unterschiedlich ($\alpha = 0.05$, $n = 54$): die Werte der RNAi-PIP1 und RNAi-PIP2 Pflanzen unterschieden sich von den Wildtypen ($p < 0.01$, bzw. $p < 0.05$), aber nicht untereinander ($p > 0.05$).

Für die Linealmessungen ergaben sich zwischen den Pflanzen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wachstumsraten ($\alpha = 0.05$, $n = 6$, $p > 0.05$); doch auch hier war die Stärke des Tests weit unterhalb des geforderten Wertes von 0.8. Ein Problem ist die kleine Stichprobenanzahl von sechs Pflanzen bei den Linealmessungen. Bei solch kleinen Stichprobenanzahlen ist die Varianz sehr groß. Doch hätten nicht mehr Pflanzen per Lineal vermessen werden können, da die Messung per Hand sonst länger gedauert hätte als die Screeningmessung und sich somit das Zeitintervall der Messung verändert hätte. So lassen sich signifikante Unterschiede nicht nachweisen, aber auch nicht sicher ausschliessen.

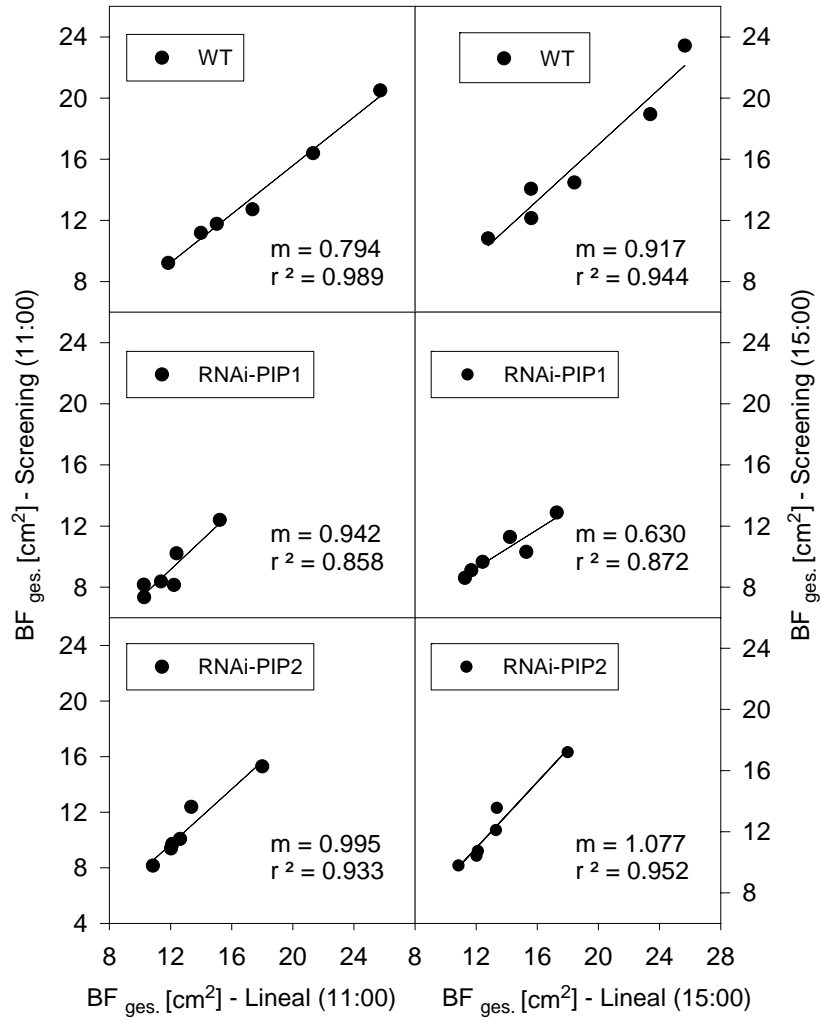


Abbildung 3.3: Vergleich der über verschiedene Methoden ermittelten $BF_{ges.}$ von *N.tabacum*. Gezeigt sind die Werte der verschiedenen transgenen Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) und des WT zu zwei Zeitpunkten desselben Tages ($n = 54$ für die Screeningmessungen und $n = 6$ für die Linealmessungen). Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung 17 Tage alt.

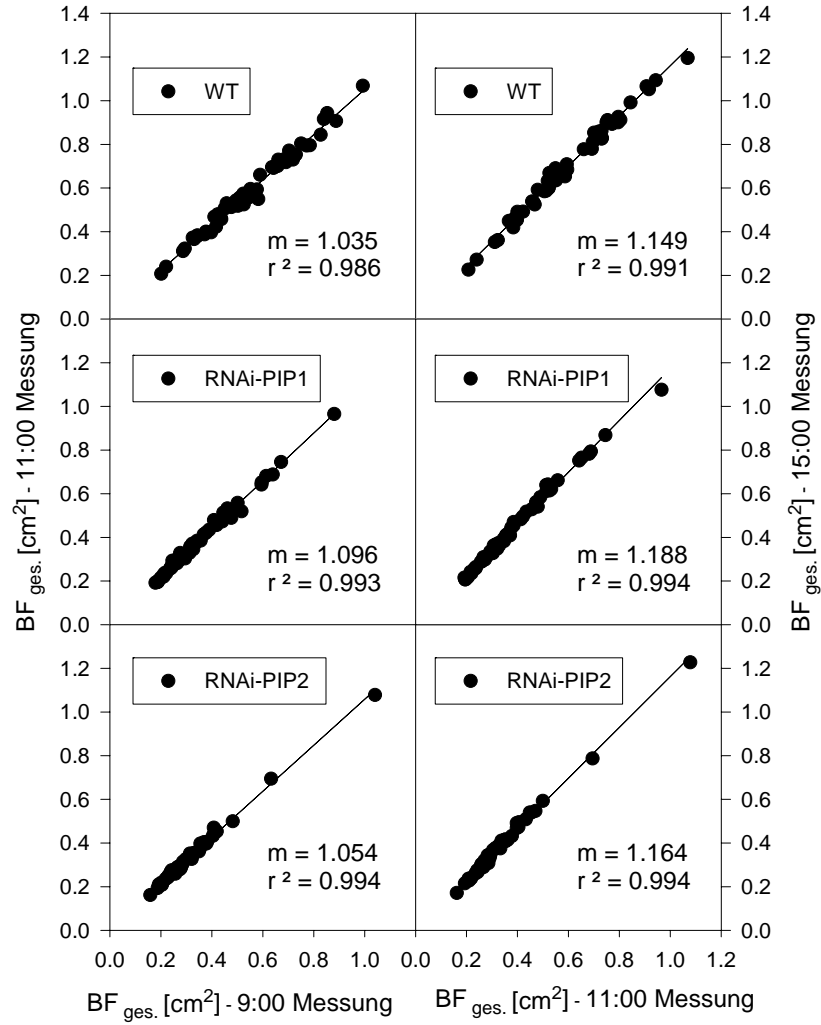


Abbildung 3.4: Änderungen der Wachstumsraten im Tagesverlauf – Messungen um 9 Uhr, 11 Uhr, 15 Uhr. Die Wachstumsraten berechnen sich aus den Steigungen (m) der Geraden. Verschiedene Linien von *N. tabacum* (WT, RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) im Vergleich ($n = 54$).

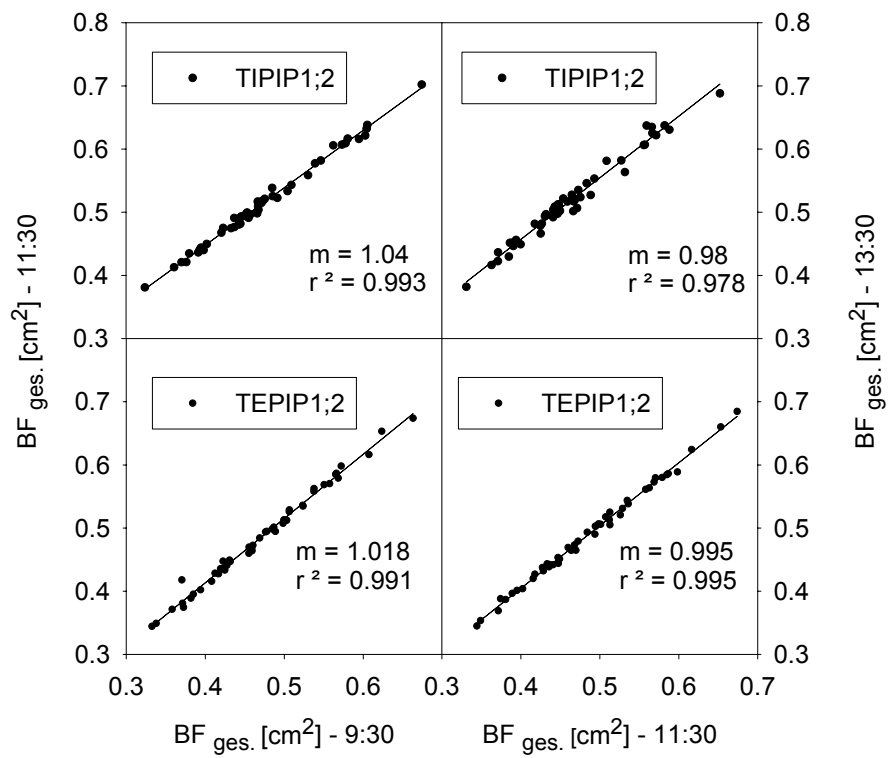


Abbildung 3.5: Änderungen der Wachstumsraten im Tagesverlauf – Messungen um 9.30, 11.30 und 13.30 Uhr. Die Wachstumsraten berechnen sich aus den Steigungen (m) der Geraden. T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* im Vergleich (TIPIP1;2, TEPIP1;2, $n = 54$).

3.3 Dynamik des Blattwachstums

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage einer Beeinflussung der zeitlichen und räumlichen Dynamik des Blattwachstums durch Aquaporine. Zwei Modellsysteme standen hierbei zur Verfügung: zum einen *N.tabacum*, Wildtyp und zwei RNAi-Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2), zum anderen zwei T-DNA-Insertionsmutanten (TIPIP1;2, TEPIP1;2) von *A.thaliana* Ökotyp Col 0. Bei den beiden Tabak RNAi-Linien war die Akkumulation der PIP1, bzw. PIP2 Proteine unterdrückt. Bei den TEPIP1;2 Pflanzen war die Expression des At-PIP1;2 ausgeschaltet (knock-out), im Gegensatz dazu wurde das Gen bei den TIPIP1;2 T-DNA-Insertionsmutanten abgelesen und somit wurden diese Pflanzen als Kontrollen verwendet. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf des Wachstums, von der Entfaltung der Kotyledonen bis zum Wachstumsstop der Blätter, bzw. zur Blütenbildung, unter optimalen Wachstumsbedingungen ermittelt und verglichen. Soweit dies möglich war, wurde auch eine räumliche Unterscheidung des Blattwachstums nach Blattstockwerken vorgenommen.

3.3.1 *N. tabacum* – Wachstum unter Gewächshausbedingungen

Bei diesem Versuch sollte der gesamte zeitliche Verlauf des Blattwachstums ermittelt werden, also von der Entfaltung der Kotyledonen bis zum Erreichen der Endblattfläche. Diese Endblattfläche ergibt sich aus der Kurvenanpassung (siehe unten). Es wurde daher sehr viel Platz für die Anzucht der Pflanzen benötigt und Wildtyp und RNAi-Pflanzen (RNAi-PIP1) im Gewächshaus angezogen (siehe Kapitel 2).

Zeitlicher Verlauf des Blattwachstums

Das Wachstum der Tabakpflanzen wurde zunächst mit Hilfe des Growscreens verfolgt, bis die Pflanzen für diesen Versuchsaufbau zu groß waren. Anschließend wurden die Blätter bis zum Beginn der Blütenbildung mit dem Lineal vermessen. In Abb. 3.6 sind die Gesamtblattflächen, sowie die relativen Wachstumsraten (*RGR*) der transgenen Pflanzen (RNAi-PIP1) und des WT einander gegenübergestellt. Der Verlauf der Kurven in Bezug auf die beiden Parameter $BF_{ges.}$ und *RGR* ist ähnlich. Um zu prüfen, ob diese signifikant unterschiedlich sind, wurden die Wachstumskurven der Blattflächen gefittet. Dazu wurde eine logistische Funktion der Form:

$$BF_{ges}(t) = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(t - t_0)}{b}}} \quad (3.1)$$

verwendet, die eine spezielle Lösung der oben genannten DGL 1.3 ist. Die logistische Gleichung eignet sich insbesondere für symmetrisch-sigmoide Kurvenverläufe, bei diesen liegt der Wendepunkt der Funktion ungefähr bei 50% der Endblattfläche [Erickson, 1976, Bertalanffy, 1960]. Abb. 3.7 zeigt die angepassten Kurven und die Mittelwerte der Gesamtblattflächen (von n=24, bzw. n=25 Pflanzen). In Tab. 3.3 sind die gefitteten Parameter angegeben: *a* gibt die

Endblattflächen¹ (in cm^2) an, t_0 die zeitliche Verschiebung der Kurven entlang der t-Achse (in Tagen), b ist eine Größe, die im weiteren Sinne in die Wachstumsgeschwindigkeit eingeht. Neben den Werten sind die jeweiligen Standardfehler angegeben.

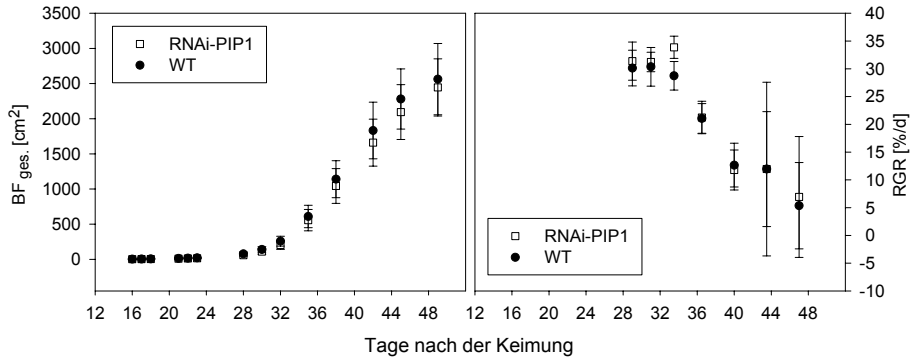


Abbildung 3.6: Zeitliche Entwicklung des Blattwachstums der transgenen Tabakpflanzen und des WT. WT ($n = 24$) und RNAi-Pflanzen (RNAi-PIP1, $n = 25$) wurden unter Gewächshausbedingungen angezogen. Screeningdaten wurden bis zum 23. Tag nach der Keimung aufgenommen, Linealmessungen anschließend bis zum 49. Tag. Gezeigt sind die Entwicklungen der Gesamtblattflächen (BF_{ges}) und relativen Wachstumsraten RGR ($MW \pm SD$).

Tabelle 3.3: Parameter der Kurvenanpassung für die Blattflächenentwicklung von *N.tabacum* unter Gewächshausbedingungen. Vergleich des WT und der transgenen Linie PIP1. Die verwendete Formel der Fitfunktion siehe Text: 3.1, angegeben sind die Parameter $\pm SE$.

Parameter	WT	RNAi-PIP1
a	2694.2521 ± 328.9489	6.8315 ± 54.7175
b	3.3789 ± 0.0777	3.4910 ± 0.1462
t_0	39.2396 ± 0.1226	39.7212 ± 0.2391

Signifikanz der Ergebnisse

Um festzustellen, ob die Unterschiede signifikant waren, betrachtet man hier die Konfidenzintervalle (CI) [Cumming and Finch, 2005], [Cumming et al., 2007]. Das sogenannte Konfidenzintervall, auch Vertrauensintervall genannt, schließt den Bereich um den geschätzten Wert des Parameters ein, z.B. die Punktschätzung des Mittelwertes der Population, der mit zuvor festgelegter Wahrscheinlichkeit die wahre Lage des Parameters trifft. Aus der gegenseitigen Lage zweier Konfidenzintervalle, insbesondere aus deren Nicht-Überschneiden,

¹Der Parameter a gibt die y-Koordinate der Asymptote des Grenzwertes der sigmoiden Kurve an; also eine hypothetische Blattfläche, der sich die echte Blattfläche annähert.

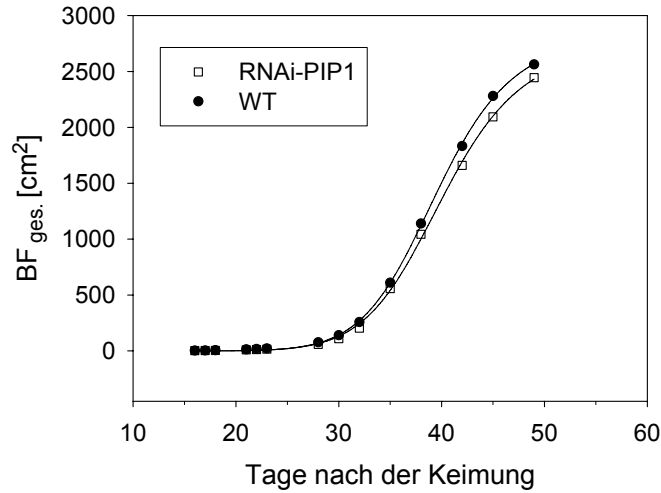


Abbildung 3.7: Blattflächenentwicklung der verschiedenen Tabakpflanzen (WT-, PIP1-Pflanzen) unter Gewächshausbedingungen. Verwendete Formel der logistischen Fitfunktion siehe Text: Formel 3.1.

läßt sich direkt die Signifikanz des Unterschiedes der entsprechenden Mittelwerte ablesen. Schätzt das Konfidenzintervall den Mittelwert der Population, dann ist die Breite des Fehlers (w) rechts und links von der Punktschätzung des Mittelwertes, gegeben durch $w = t_{(n-1),C} * SE$, dabei bezeichnet C den Konfidenzlevel (in der Regel 95%), n die Stichprobengröße und SE den Standardfehler. Multipliziert man also die Standardfehler noch mit einer Konstanten ($w = t_{(n-1),C} * SE$), ergibt sich das Konfidenzintervall. Diese Konstante ($t_{(n-1),C}$) ist der kritische t-Wert, der mit n und C variiert. Für die folgenden Abschätzungen wurde dieser kritische t-Wert für die entsprechenden n und C aus Tabellen entnommen (<http://psydok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2004/268/html/tvert.htm>). Mit dieser Methode ist es möglich eine Abschätzung des p-Wertes vorzunehmen; es ist hingegen nicht möglich, den exakten p-Wert zu bestimmen. Dies ist jedoch auch nicht immer erforderlich. Meist ist von Interesse, ob ein Unterschied auf einem bestimmten Niveau signifikant ist, der genaue p-Wert spielt dann keine Rolle. Liegt keine Überlappung der Konfidenzintervalle vor, so ist der Unterschied signifikant. Überlappen die Konfidenzintervalle, so hängt es von der Stichprobenanzahl (n) und dem Grad der Überlappung ab, ob eine Signifikanz vorliegt oder nicht [Cumming and Finch, 2005], [Cumming et al., 2007]. Nur für jene Fälle wurde ein Test durchgeführt, in denen sich die Konfidenzintervalle überschneiden. In allen anderen Fällen ergab eine Abschätzung der Überschneidungen der Konfidenzintervalle, p-Werte von zumindest 0.05 oder 0.01.

Betrachtet man die Werte der Parameter a , b und t_0 und deren Konfidenzintervalle, (kritischer t-Wert für $n = 20$ und $C = 95\%$ ist 2.086), so zeigte sich, dass keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden können (siehe Abb. 3.8). Es wurde deswegen für jeden der Parameter noch ein t-Test durchgeführt

(mit $n = 24$, bzw. 25, $\alpha = 0.05$). Auch mit Hilfe des t-Tests liessen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen: für die Endblattflächen (a) ergab sich ein p-Wert von 0.898 und ein Wert von 0.050 für die Stärke ($1 - \beta$), für den Parameter b ein p-Wert von 0.480 und ein Wert von 0.050 für die Stärke, und für die zeitliche Verschiebung (t_0) ein p-Wert von 0.275 und ein Wert von 0.070 für die Stärke des Tests.

Die Kurven der RNAi-PIP1 Pflanzen liegen unterhalb derjenigen der Wildtyppflanzen, die Differenz der Verschiebung beträgt ca. einen halben Tag, d.h. es könnte ein unterschiedlicher Startpunkt der Kurven vorliegen. Da die Stärke des Tests jedoch zu niedrig war und damit der β -Fehler zu hoch, konnte dies mit dieser Stichprobenanzahl nicht signifikant nachgewiesen werden.

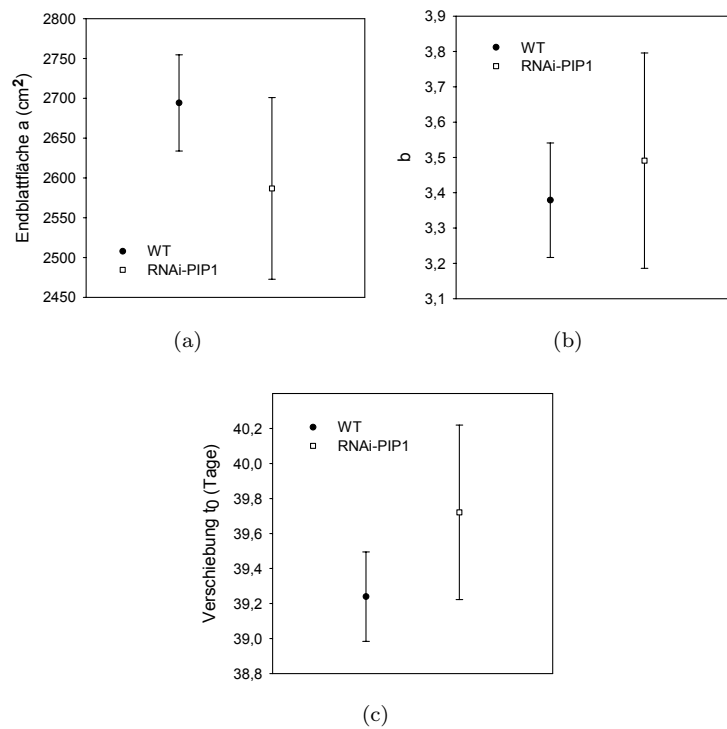


Abbildung 3.8: 95 % Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter a , b und t_0 , die aus der Kurvenanpassung des Gewächshausversuchs ermittelt wurden (siehe oben 3.3.1). a.) Endblattflächen (a) $\pm 95\%$ CIs, b.) Wachstumsdynamik (b) $\pm 95\%$ CIs, c.) zeitliche Verschiebungen (t_0) $\pm 95\%$ CIs

Unterschiede der Blattflächen in Abhängigkeit der Blattposition

Aus den Linealmessungen war es möglich, den Zuwachs der Blattflächen einzelner Blattpositionen zu berechnen. Pflanzliche Aquaporine weisen räumlich und zeitlich unterschiedliche Expressionsmuster auf, deswegen schien es sinnvoll, auch zwischen den einzelnen Blattpositionen zu unterscheiden. Mittels eines t-Tests wurde geprüft, ob es signifikante Unterschiede bezüglich der Blattflächen zwischen den Pflanzen gab ($\alpha = 0.05$, wenn $p \leq 0.05$ signifikanter Unter-

schied zwischen den Proben). In Abb. 3.9 sind die Gesamtblattflächen (cm^2) der beiden untersuchten Blattpositionen (5,6, untere Blattpositionen) gezeigt. Ein Zeitpunkt, der Beginn der Linealmessungen (28.Tag nach der Keimung) wurde getestet. Die Flächen des Blattes 5 sind zwischen dem WT und den RNAi-PIP1-Pflanzen signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.001$), bei den Blattflächen des Blattes 6 ist ebenfalls zu Beginn der Linealmessungen ein signifikanter Unterschied ($p = 0.007$) nachzuweisen. Alle anderen Blattpositionen wurden ebenfalls getestet, doch war es dort nicht möglich einen signifikanten Unterschied nachzuweisen, denn in diesen Fällen lag die Stärke des Tests unterhalb des benötigten Wertes von 0.8. Dies bedeutet zwar nicht unbedingt, dass es nicht doch einen signifikanten Unterschied gibt, er ist aber mit dieser Anzahl Pflanzen nicht nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten zwischen den RNAi-PIP1-Pflanzen und dem WT Unterschiede in den Blattflächen der verschiedenen Positionen gibt. Dieser Effekt ist bei den unteren Blattpositionen 5 und 6 signifikant nachzuweisen für den 28. Tag nach der Keimung. Bei den höheren Blattpositionen ist der Effekt schwächer und mit dieser Stichprobengröße nicht signifikant nachzuweisen.

3.3.2 *N. tabacum* – Wachstum unter Klimakammerbedingungen

Im folgenden Versuch wurden im Anschluss an Wachstumsuntersuchungen mit den gleichen Pflanzen noch Gaswechsel- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1). Um für diese Untersuchungen eine bessere Kontrolle der Umweltbedingungen zu gewährleisten, wurden die Pflanzen in einer Klimakammer angezogen und deren Wachstumsverhalten unter diesen Bedingungen ebenfalls analysiert. Zusätzlich zu den RNAi-PIP1-Pflanzen standen nun auch RNAi-PIP2-Pflanzen zur Verfügung.

Zeitliche Entwicklung der Blattflächen

Vom fünften Tag nach der Keimung bis zum 18. Tag wurde das Blattwachstum mit Hilfe des Screeningsystems verfolgt und anschließend die Photosynthese der Pflanzen über ca. 14 Tage verfolgt. In Abb. 3.10 ist die Blattflächenentwicklung der transgenen Pflanzen (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) und des WT dargestellt. Die Dynamik der Gesamtblattflächenentwicklung scheint wieder ähnlich für die transgenen Linien und den WT zu sein. Die Kurven der RNAi-PIP1- und RNAi-PIP2- Pflanzen liegen nah beieinander, aber etwas unterhalb derjenigen des WT. Um den Kurvenverlauf genauer analysieren zu können, wurden wieder Funktionen angefügt. Da die Endblattflächen in diesem Versuch nicht bestimmt werden konnten, war es nicht möglich, einen sigmoiden Verlauf anzupassen. Deswegen musste eine exponentielle Anpassung der Kurven vorgenommen werden. Da vor allem ermittelt werden sollte, ob es auch unter diesen Wachstumsbedingungen eine zeitliche Verschiebung zwischen den Kurven der Transgenen und des WT gibt, wurde folgende exponentielle Funktion für den WT verwendet:

$$BF_{ges}(t) = a * e^{(bt)} \quad (3.2)$$

und folgende Funktion für die transgenen Pflanzen:

$$BF_{ges}(t) = a * e^{b(t - t_0)} \quad (3.3)$$

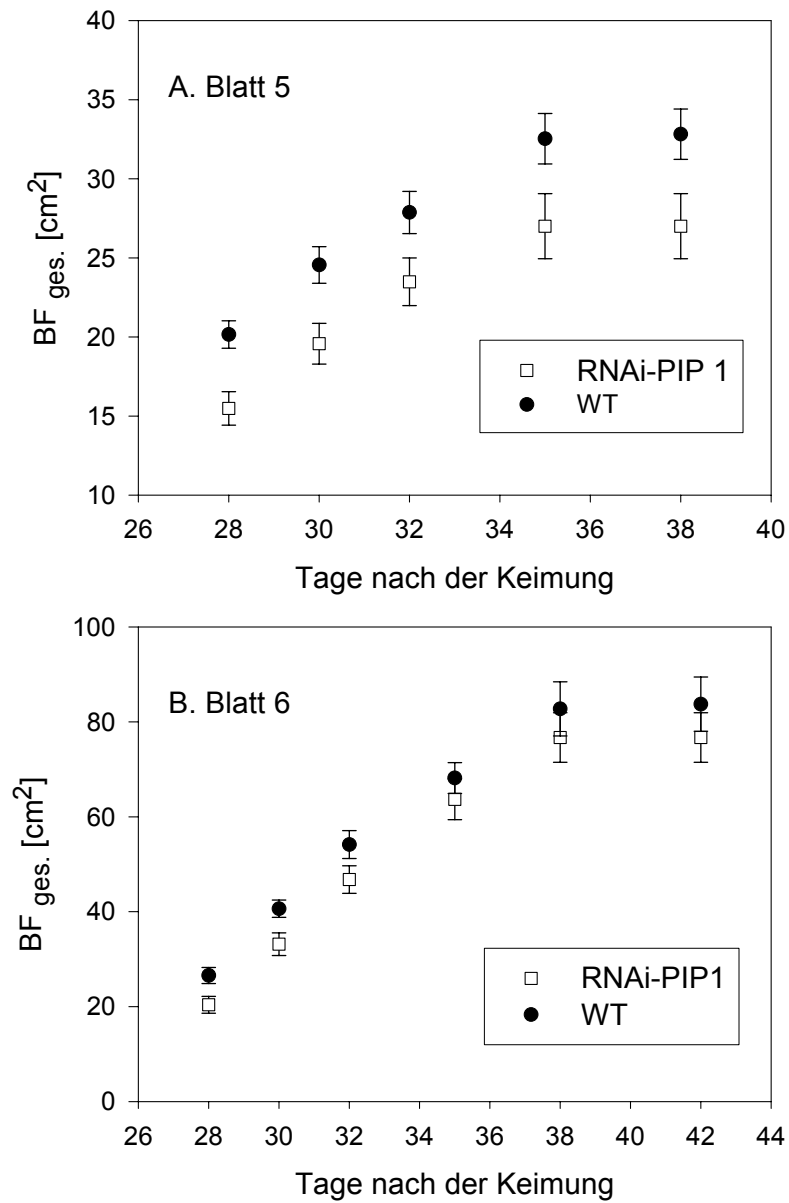


Abbildung 3.9: Gezeigt sind Unterschiede der Blattflächen in Abhängigkeit von den Blattpositionen (5, 6). Vergleich des WT (*N.tabacum*) und der transgenen RNAi-PIP1-Pflanzen (n=24; MW \pm SE).

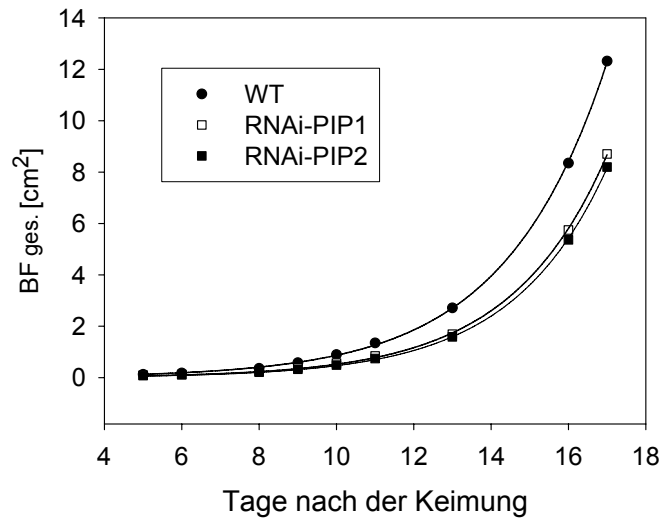


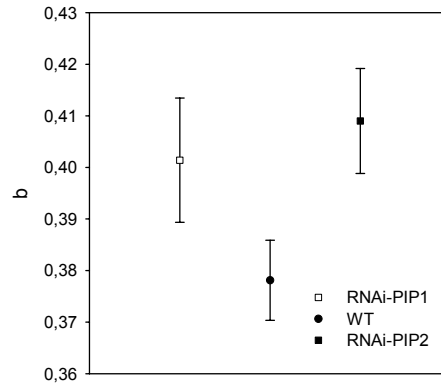
Abbildung 3.10: Blattflächenentwicklung der verschiedenen Tabaklinien (WT, RNAi-PIP1, RNAi-PIP2) unter optimalen Wachstumsbedingungen in der Klimakammer. Die Anpassung der Kurven erfolgte mit Hilfe der Formeln 3.2 und 3.3, siehe Text. Pro Pflanzenlinie und Zeitpunkt wurden 54 Pflanzen gemessen ($n = 54$).

a steht in den obigen Gleichungen für den Startwert der Funktion, b hängt mit der Wachstumsgeschwindigkeit zusammen und t_0 gibt die zeitliche Verschiebung (in Tagen) der Kurven der transgenen Pflanzen in Bezug zum Wildtyp an. Für den Wildtyp ist t_0 dann 0, da der Wildtyp sich selbst gegenüber als nicht verschoben angenommen wird, daher die scheinbar verschiedenen Gleichungen. Weiterhin wurde die Annahme gemacht, dass die Endblattfläche der transgenen und Wildtyp Pflanzen gleich ist. Im vorhergehenden Versuch unterschieden sich die Endblattgrößen der Wildtyp und transgenen Pflanzen (RNAi-PIP1) nicht voneinander. In Tab. 3.4 sind die ermittelten Werte der Parameter zusammengefasst und in Abb. 3.11 die Parameter mit ihren 99% Konfidenzintervallen dargestellt (kritischer t-Wert für $n = 50$ und $C = 99\%$ ist 2.678). Zwischen den transgenen Pflanzen auf der einen Seite und den Wildtyp Pflanzen auf der anderen Seite gibt es einen signifikanten Unterschied bezüglich des Parameters b (p-Wert < 0.01), und ebenso in Hinblick auf den Parameter t_0 (p-Wert < 0.01) wie man aus den Konfidenzintervallen schliessen kann.

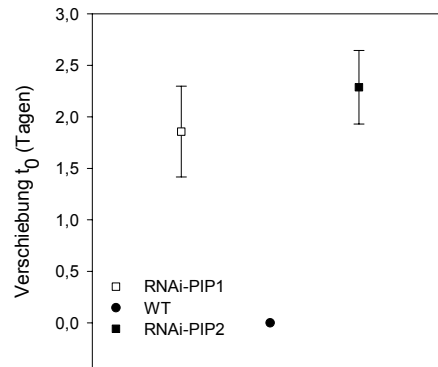
Dies bedeutet, dass die Kurven der transgenen Pflanzen gegenüber dem WT signifikant verschoben sind (um ca. 1-2 Tage, Differenz der t_0 -Werte, p-Wert < 0.01). Der Parameter b der transgenen Pflanzen unterscheiden sich zwar signifikant von denen der Wildtyppflanzen, dies wirkt sich jedoch nicht spürbar auf den Kurvenverlauf aus: die Kurven der transgenen Pflanzen verlaufen während der betrachteten Wachstumsphase unterhalb derer der WT und nicht darüber, d.h. die Verschiebung wirkt sich stärker aus.

Tabelle 3.4: Parameter der Kurvenanpassung für die Blattflächenentwicklung von *N.tabacum*. Vergleich des WT und der beiden transgenen Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2). Die verwendeten Formeln 3.2 und 3.3 finden sich im Text, angegeben sind die Parameter $\pm SE$.

Parameter	WT	RNAi-PIP1	RNAi-PIP2
a	0.0199 ± 0.0010	0.0199	0.0199
b	0.3781 ± 0.0029	0.4014 ± 0.0045	0.4090 ± 0.0038
t_0	-	1.8576 ± 0.1646	2.2880 ± 0.1334



(a)



(b)

Abbildung 3.11: 95 % Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter b und t_0 , die aus der Kurvenanpassung des Klimakammerversuchs ermittelt wurden (siehe oben 3.3.2). a.) Wachstumsdynamik (b) $\pm 99\%$ CIs, b.) zeitliche Verschiebungen (t_0) $\pm 99\%$ CIs

3.3.3 DISP-Messungen an Tabakblättern

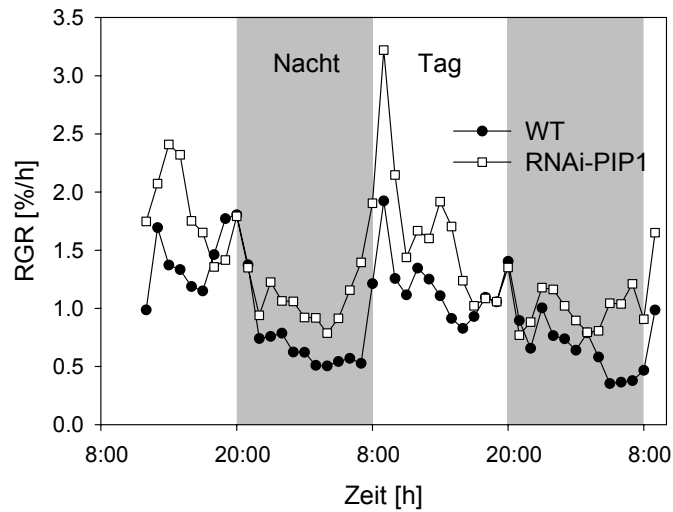
Neben der Analyse der Gesamtblattflächenentwicklung wurden auch Einzelblattmessungen an WT-, und RNAi-PIP1-Pflanzen mittels der DISP-Methode durchgeführt, um Tagesgänge des Wachstums vergleichen zu können. In der Regel wurde das Wachstum eines Blattes über 48 Stunden verfolgt. In einem weiteren Versuchansatz wurden die Pflanzen einem 30 minütigen Lichtwechsel über 12 Stunden ausgesetzt.

In Abb. 3.12 und Abb. 3.13 sind exemplarisch mehrere Tagesgänge dargestellt. Aufgetragen sind zum einen die relativen Wachstumsraten (RGR) in %/h, also die Stundenmittelwerte, zum anderen die normierten Werte der RGR, also die RGR als % vom Tagesdurchschnitt. In letzterem Falle wurden jeweils zwei Tage gemittelt. Die Pflanzen wurden vor der eigentlichen Messung erst einige Stunden an den Aufbau adaptiert, bevor die eigentliche Messung gestartet wurde. Auf den ersten Blick sieht man die größten Unterschiede der RGR am Wechsel der Licht-, und Dunkelphase und entsprechend der Dunkel-, und Lichtphase, wenn die Stomata öffnen, bzw. schließen. Ungefähr in der Mitte der Lichtphase gibt es eine Phase stärkeren Wachstums. Die Lage und Höhe der Maxima und Minima variieren z.T. erheblich zwischen den Pflanzen: nicht nur zwischen den Pflanzen der beiden Linien, sondern auch innerhalb derselben Linie und des gleichen Blattstockwerks. In Abb. 3.12 (a) sieht man dies sehr deutlich: während der ersten Dunkelphase reagieren WT und RNAi-PIP1-Pflanzen gleich, die RGR fällt zunächst ab und steigt dann zum Ende der Dunkelphase an. In der nachfolgenden Lichtphase erreicht die RGR beider Pflanzen ein Maximum, fällt dann wieder ab und ungefähr in der Mitte der Lichtphase gibt es erneut ein, etwas kleineres, Maximum. In der zweiten Dunkelphase jedoch reagieren beide Pflanzen etwas unterschiedlich; zur Mitte der Dunkelphase steigt die Kurve der RNAi-PIP1-Pflanze stärker und schneller an, die RGR des WT fällt stärker ab und steigt am Lichtwechsel weniger stark an. So zeigen sich beim WT und RNAi-PIP1-Pflanze ein unterschiedliches Verhalten zur ersten Dunkelphase. Normiert man die Werte auf das Tagesmittel (Abb. 3.12 (b)), so zeigt sich vor allem in der zweiten Hälfte der Dunkelphase ein Unterschied, daneben deutet sich eine Verschiebung des zweiten, kleineren Maximums während der Lichtphase zwischen WT und RNAi-PIP1-Pflanze an. Betrachtet man dagegen Abb. 3.13 (a), so zeigt sich ebenfalls erst in der zweiten Dunkelphase ein Unterschied zwischen den Pflanzen; die RGR des WT steigt dabei steiler und gleichmäßiger an, als die der RNAi-PIP1-Pflanze. Betrachtet man die normierten Werte (Abb. 3.13, (b)), so fällt auf, dass die Werte konträr zu der vorherigen Messung sind: während der Dunkelphase sind die Werte des WT größer als die der RNAi-PIP1-Pflanze. Wie man sieht, müssen entsprechend viele Wiederholungen gemacht werden, um die individuelle Unterschiede herauszumitteln. Es fällt jedoch auf, dass Unterschiede vor allem im Bereich der Lichtwechsel und während der Nacht am ausgeprägtesten zu finden sein dürften.

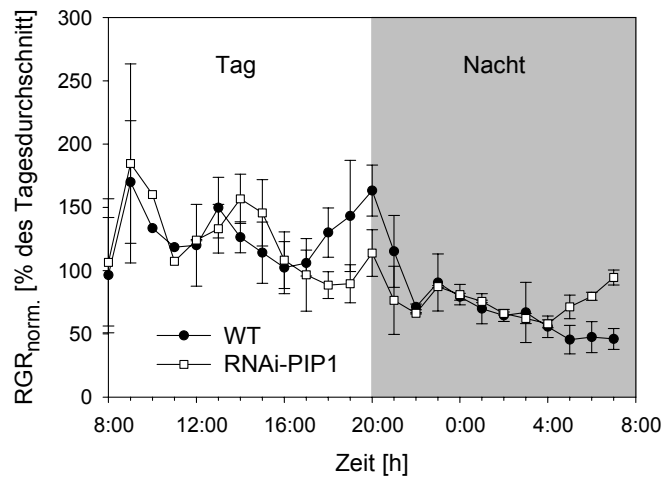
Bei der Auswertung sollten also insbesondere die Wechsel zwischen Licht- und Dunkelphase (und umgekehrt) betrachtet werden. In diesen Bereichen der Kurven sind die Veränderungen der RGR am größten und der Peak an diesen Übergängen resultiert aus dem Öffnen, bzw. Schließen der Stomata. Gerade die RNAi-PIP1-Pflanzen scheinen z.T. recht starke Abfälle bis weit in den negativen

Bereich zu haben. Untersuchungen an ähnlichen Pflanzen, NtAQP1 antisense-Tabakpflanzen, zeigten außerdem Oszillationen der Stomatabewegung [Uehlein et al., 2003]. Sollte es Unterschiede im Tagesgang des Wachstums zwischen den Pflanzen geben, sind sie in den Bereichen der Lichtwechsel vielleicht am deutlichsten. Aus diesem Grund sollten die Höhen der Amplituden im Bereich der Lichtwechsel miteinander verglichen werden. Voraussetzung hierfür sind jedoch genaue Bestimmungen der Maxima und Minima an diesen Stellen. Dies stellte jedoch ein Problem dar, denn gerade an den Stellen der höchsten, bzw. niedrigsten Zuwachsraten, gab es Sprünge in den Sequenzen, d.h. an diesen Stellen war es nicht möglich die Parameter so zu optimieren, dass der Rang gleich zwei wurde. Egal welche Filter benutzt wurden ($7 \times 7 \times 7$, oder $7 \times 7 \times 2$), oder welche zeitliche Auflösung bei der Bildaufnahme (2 min, 1 min oder 30 sec) verwendet wurde, der Rang war an vielen dieser Stellen gleich drei, d.h. an dieser Stelle liefert der Algorithmus keine Information. So wurde zu diesem Zeitpunkt auf eine weitere Auswertung der Daten verzichtet.

In einem etwas anderen Versuchsansatz wurde die Änderung der Wachstumsraten in Abhängigkeit eines Licht-, Dunkelrhythmus von 30 min über 12 Stunden gemessen, da die interessantesten Unterschiede zwischen WT und PIP1 in Lichtwechselsituationen vermutet wurden. In Abb. 3.14 ist das Ergebnis dieser Messungen für WT-, und RNAi-PIP1-Pflanze gezeigt. Vergleicht man die beiden Kurven miteinander, sind die Amplituden der Kurven sehr unterschiedlich: die der transgenen Pflanze sind über den gesamten Messzeitraum sehr viel höher als die des WT. Zum Ende der 12 Stunden sind die Amplituden des WT so flach, dass kaum mehr ein Unterschied zwischen Hell-, und Dunkelphase erkannt werden kann. Da dieser Versuch nur an je einer Pflanze durchgeführt wurde, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass Pflanzen der RNAi-PIP1-Linie immer stärker reagieren als die WT-Pflanzen: vielleicht war gerade diese WT-Pflanze in der Entwicklung etwas weiter und deswegen fallen die Änderungen schwächer aus. Jedoch lässt sich erkennen, dass beide Pflanzen ähnlich reagieren, also ihre Stomata im Licht-, Dunkelrhythmus öffnen und schließen, aber vielleicht mit einer anderen Amplitude. Die RNAi-PIP1-Pflanzen zeigen eventuell eine stärkere Reaktion gegenüber dem Lichtwechsel. Dies hätte mit einer größeren Anzahl Messungen überprüft werden müssen, doch ergaben sich auch hier die gleichen Schwierigkeiten bei der Analyse der Sequenzen wie oben und es wurde deswegen auf weitere Messungen verzichtet.

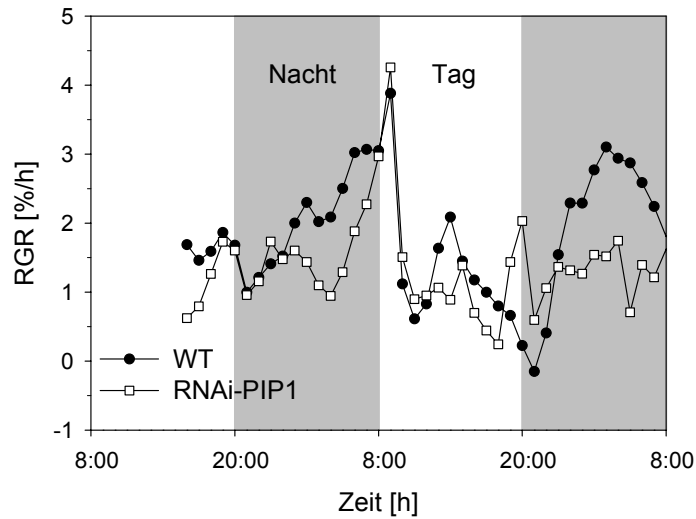


(a) Tagesgang des Wachstums (Stundenmittelwerte der RGR), Sequenz vom 15.08.05 - 17.08.05

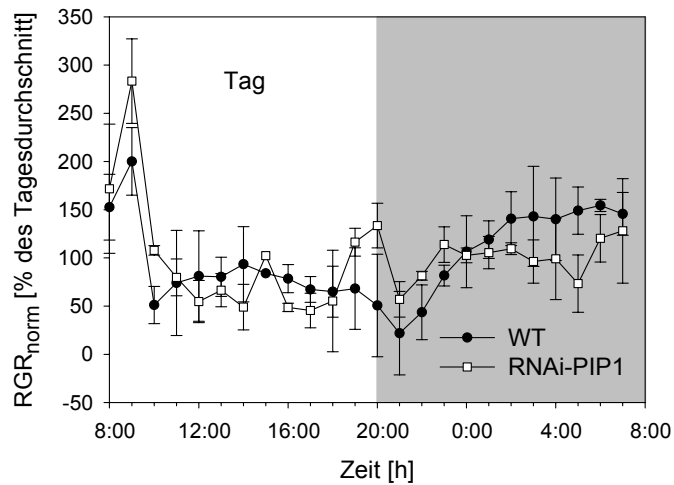


(b) Tagesgang des Wachstums (normierte Werte der RGR), Sequenz vom 15.08.05 - 17.08.05

Abbildung 3.12: Tagesgang der relativen Wachstumsrate (RGR) von vier Wochen alten *N.tabacum*-Pflanzen: WT und transgene Pflanzen (RNAi-PIP1) im Vergleich, Sequenz vom 15. - 17. August. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Die RGR wurde mittels DISP-Methode bestimmt. a.) zeigt die RGR in %/h, b.) zeigt die normierten Werte der RGR in % vom Tagesdurchschnitt; n=1, jeweils 2 Tage gemittelt.

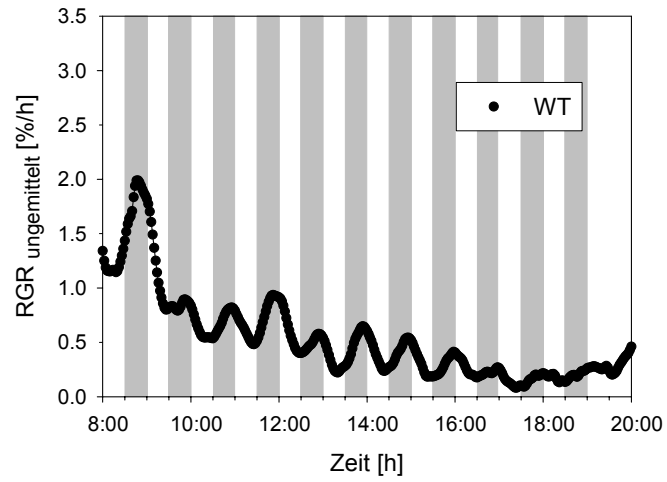


(a) Tagesgang des Wachstums (Stundenmittelwerte der RGR), Sequenz vom 5.09.05 - 7.09.05

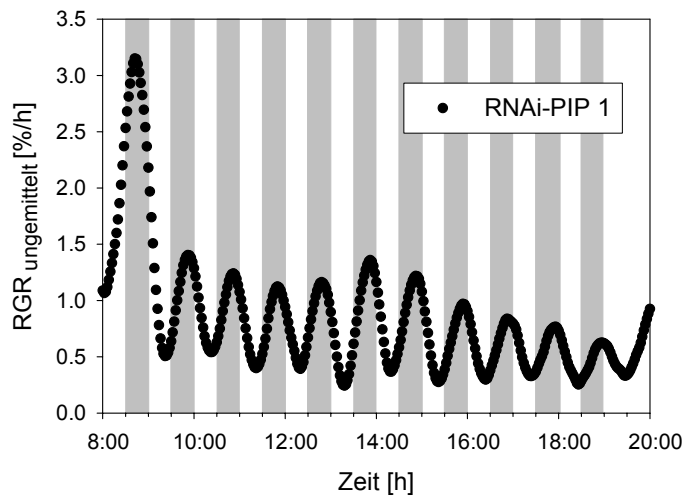


(b) Tagesgang des Wachstums (normierte Werte der RGR), Sequenz vom 5.09.05 - 7.09.05

Abbildung 3.13: Tagesgang der relativen Wachstumsrate (RGR) von vier Wochen alten *N.tabacum*-Pflanzen: WT und transgene Pflanzen (RNAi-PIP1) im Vergleich, Sequenz vom 5. - 7. September. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Die RGR wurde mittels DISP-Methode bestimmt. a.) zeigt die RGR in %/h, b.) zeigt die normierten Werte der RGR in % vom Tagesdurchschnitt; n=1, jeweils 2 Tage gemittelt.



(a) *N. tabacum*, WT



(b) *N. tabacum*, RNAi-PIP1

Abbildung 3.14: Einzelblattmessung von *N. tabacum*: WT und transgene Pflanzen (PIP1) im Vergleich. Während einer Phase von 12 Stunden wurde im 30 Minuten Rhythmus das Licht an-, oder ausgeschaltet. Hell unterlegt sind die Lichtphasen. Gemessen wurde Blattposition 12 von vier Wochen alten Pflanzen ($n = 1$).

3.3.4 *A.thaliana* - Wachstumsverhalten der T-DNA Insertionsmutanten

Die Entwicklung der Blattflächen der *A.thaliana*-Insertionsmutanten wurde über mehrere Wochen, von der Entfaltung der Kotyledonen (zweiter Tag nach der Keimung) bis zur Entwicklung der Blüten (71. Tag nach der Keimung), verfolgt. Zunächst wurde das Wachstum mit Hilfe des Growscreens gemessen. Nachdem die Pflanzen für diesen Versuchsaufbau zu groß waren (nach dem 37. Tag nach der Keimung), wurde der Spross eines Teils der Pflanzen ($n = 10 - 20$) geerntet und die Blattflächen eingescannt. Um die Kurven der Gesamtblattflächenentwicklung miteinander vergleichen zu können, wurde auch in diesem Fall eine Kurvenanpassung vorgenommen.

Dazu wurde wiederum eine logistische Funktion der Form (identisch mit Gleichung 3.1 in Kapitel 3.3.1):

$$BF_{ges}(t) = \frac{a}{1 + e^{\frac{-(t - t_0)}{b}}}$$

verwendet, die eine spezielle Lösung der oben genannten DGL 1.3 ist. Abb. 3.15 zeigt die angepassten Kurven und die Messpunkte der Gesamtblattflächen. In Tab. 3.5 sind die Parameter der gefitteten Kurven angegeben: a gibt wieder die Endblattflächen (in cm^2) an, t_0 die zeitliche Verschiebung (in Tagen) der Kurven entlang der t-Achse, b ist eine Größe, die im weiteren Sinne in die Wachstumsgeschwindigkeit eingeht. Neben den Werten sind die jeweiligen Standardfehler angegeben. Aus den Konfidenzintervallen der Parameter, siehe Abb. 3.16 ist ersichtlich, dass die Endblattflächen (a) der beiden Insertionsmutanten sich nicht signifikant voneinander unterscheiden (kritischer t-Wert für $n = 20$ und $C = 95\%$ ist 2.086). Jedoch gibt es eine signifikante zeitliche Verschiebung (t_0) zwischen den Kurven (kritischer t-Wert für $n = 20$ und $C = 99\%$ ist 2.845, p-Wert < 0.01) von ca. einem halben bis einem Tag. Ebenso unterscheiden die Kurven sich signifikant in dem Parameter b voneinander (kritischer t-Wert für $n = 20$ und $C = 95\%$ ist 2.845, p-Wert < 0.05), dieser Unterschied ist jedoch weniger ausgeprägt als die Verschiebung. Betrachtet man Abb. 3.15, so sind die Kurven in ihrem Verlauf sehr ähnlich, jedoch ist erkennbar, dass die Steigung der Kurve der Insertionsmutanten TIPI1;2 ein klein wenig steiler ausfällt. Dies bedeutet, dass diese Pflanzen eine ein wenig schnellere Wachstumsgeschwindigkeit am Anfang besitzen. Im Laufe der Zeit, steigt die Wachstumsgeschwindigkeit der TEPI1;2 Insertionsmutanten an, so dass am Ende des Versuchszeitraums die gleiche Endblattfläche erreicht wird.

3.3.5 Relativer Wassergehalt der *Arabidopsis* T-DNA-Insertionsmutanten

Exemplarisch für einen Zeitpunkt - den 57. Tag nach der Keimung - wurden die relativen Wassergehalte der Blätter der beiden Insertionsmutanten von *A.thaliana* aus den Frisch- und Trockengewichten bestimmt. Mit Hilfe einer 1-Weg ANOVA ($\alpha=0.05$, $n=20$), wurde geprüft, ob es zwischen den Blättern der Insertionsmutanten Unterschiede bezüglich des relativen Wassergehaltes gab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Wassergehalten der Pflanzen konnte

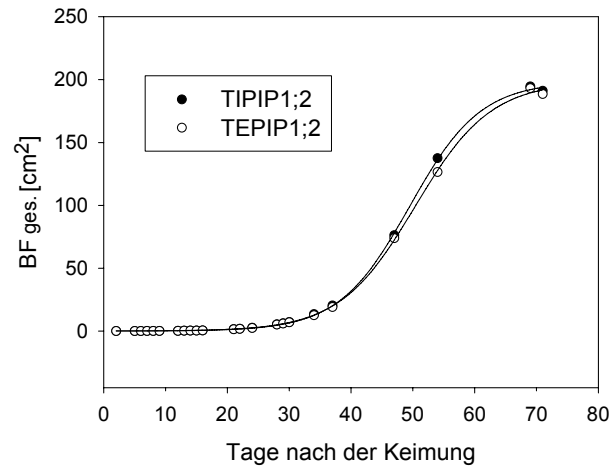


Abbildung 3.15: Blattflächenentwicklung der T-DNA-Insertionsmutanten, TIPIP1;2 und TEPIP1;2, von *A.thaliana*. $n = 54$, bzw. $n = 10$, $n = 20$ (ab dem 37. Tag nach der Keimung). Verwendete Fitfunktion siehe oben im Text.

Tabelle 3.5: Parameter der logistischen Kurvenanpassung der Blattflächenentwicklung. Vergleich der Parameter von *A.thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten TIPIP1;2 und TEPIP1;2.

Parameter	TIPIP1;2	TEPIP1;2
a	198.4557 ± 0.9429	198.4178 ± 1.2228
b	5.7357 ± 0.0916	6.1133 ± 0.1179
t_0	49.4947 ± 0.1191	50.3816 ± 0.1578

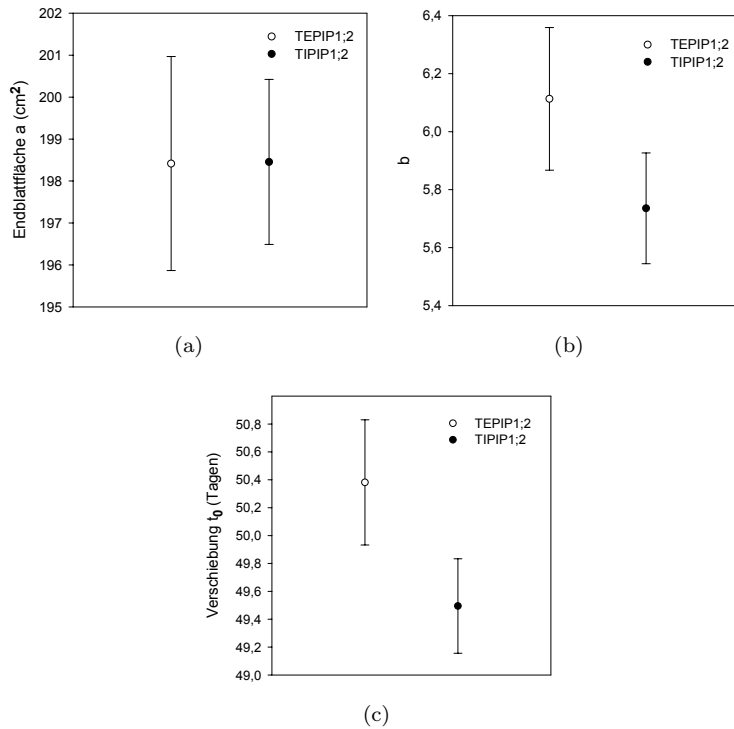


Abbildung 3.16: Blattflächenentwicklung der T-DNA-Insertionsmutanten von *A.thaliana*: Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter a , b und t_0 , die aus der Kurvenanpassung ermittelt wurden (siehe oben). a.) Endblattflächen (a) $\pm 95\%$ CIs, b.) Wachstumsdynamik (b) $\pm 95\%$ CIs, c.) zeitliche Verschiebungen (t_0) $\pm 99\%$ CIs

nicht nachgewiesen werden: $p \leq 0.079$, Stärke des Tests ≤ 0.8 . Die Mittelwerte der Wassergehalte liegen sehr nahe beieinander: 92.79 ± 0.15 (TIPIP1;2) und 92.78 ± 0.07 (TEPIP1;2). Hinzu kommt, dass die Stärke des Tests unterhalb des geforderten Wertes von 0.8 liegt, d.h. es kann letztlich nicht ausgeschlossen werden, dass der Wassergehalt der Pflanzen zu diesem Zeitpunkt doch unterschiedlich ist. Um dies entscheiden zu können, hätten die Stichprobengrößen stark erhöht werden müssen (50-60 Pflanzen), damit der Test gegebenenfalls statistisch signifikant wird.

3.4 Photosynthesemessungen

Das Aquaporin NtAQP1 aus *N.tabacum* erhöht die CO_2 -Leitfähigkeit der Membran in *Xenopus* Oozyten [Uehlein et al., 2003], weiterhin gibt es Hinweise, dass die Expression dieses Aquaporins die CO_2 -Leitfähigkeit des Mesophylls (g_m) verändern kann [Flexas et al., 2006]. Der Mechanismus der Stomatabewegung wird ebenfalls beeinflusst von der Expression dieses Gens; bei antisense NtAQP1 Pflanzen traten Oszillationen der stomatären Öffnungsweite nach der lichtinduzierten Öffnung der Stomata auf [Uehlein et al., 2003]. Sowohl die Mesophyll-Leitfähigkeit, als auch die stomatären Öffnungsweiten können die Photosyntheseraten beeinflussen und somit auch einen Einfluss auf das Wachs-

tum ausüben. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die Wachstumsanalysen (siehe Kapitel 3.3.2) mit den gleichen Pflanzen auch Photosynthesemessungen durchgeführt.

3.4.1 Gaswechsel

Lichtkurven

In Abb. 3.17 ist für Blattposition 7 (eine der unteren Blattpositionen) die Reaktion der Netto-Photosyntheserate auf eine Erhöhung der Lichtintensität gezeigt. Es wurden jeweils Mittelwerte von vier Pflanzen gebildet. Eine Anpassung der Daten wurde mit einer nichtlinearen Funktion, der Mitscherlich Gleichung [Potvin et al., 1990], vorgenommen:

$$A = A_{max} * [1 - e^{-A_{qe} * (PPF - LCP)}] \quad (3.4)$$

dabei bezeichnet A_{max} , die maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate, A_{qe} den linearen Anstieg zu Beginn der Kurve, LCP den Lichtkompensationspunkt und PPF den photosynthetischen Photonfluss. In Tab. 3.6 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung zusammengefasst. Die maximale lichtgesättigte Photosyntheserate: A_{max} ist bei den Wildtyppflanzen geringfügig größer (42.8 ± 0.5) als bei den transgenen Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2; 40.6 ± 0.6 , bzw. 41 ± 0.6), doch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Die Steigungen der Kurven (A_{qe}) und die Werte der Lichtkompensationspunkte (LCP) unterscheiden sich zwischen den Tabaklinien nicht.

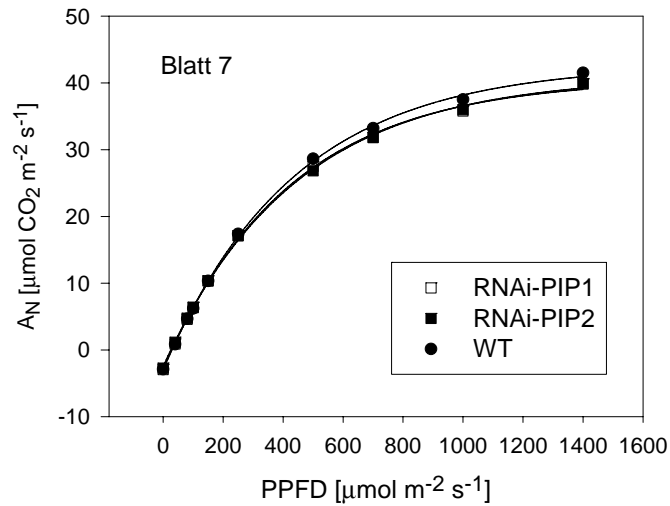


Abbildung 3.17: Lichtkurven der verschiedenen Tabaklinien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2, WT). Es wurde die siebte Blattposition gemessen (MW, n=6). Die Formel der verwendete Fitfunktion, Formel 3.4, findet sich im Text. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung zwischen 25 und 30 Tage alt.

Tabelle 3.6: Parameter der Kurvenanpassung für die Lichtkurven von *N.tabacum*. Vergleich des WT und der beiden transgenen Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2). Die verwendete Formel, Formel 3.4, findet sich im Text. Angegeben sind die Parameter $\pm SE$, $n=6$.

Parameter	WT	RNAi-PIP1	RNAi-PIP2
A_{max}	42.8 ± 0.5	40.6 ± 0.6	41 ± 0.6
A_{qe}	0.0023 ± 0.0001	0.0024 ± 0.0001	0.0024 ± 0.0001
LCP	29.4 ± 2.36	28.5 ± 2.94	25.7 ± 2.85

A/C_i Kurven

Nach dem Modell von Farquhar et al. [Farquhar et al., 1980, von Caemmerer, 2000] sind die Carboxylierungsraten durch einen der drei, bzw. zwei, Prozesse limitiert (nicht immer ist eine Limitierung durch (iii) gegeben):

- (i) die Menge, Aktivität und Kinetik der Rubisco (W_c)
- (ii) die Regenerationsrate des Ribulose-1,5-bisphosphat (W_j)
- (iii) die Triosephosphat Verfügbarkeit (W_p)

In der zusammenfassenden Formel dieser drei bzw. zwei Phasen limitiert das jeweilige Minimum der Faktoren die CO_2 -Assimilation. Durch eine Anpassung dieser Phasen lassen sich biochemisch-kinetische Schlüsselvariablen der Photosyntheseraten bestimmen: $V_{c,max}$ (maximale Carboxylierungsrate der Rubisco), J_{max} (lichtgesättigte Elektronentransportrate), V_{TPU} (Verfügbarkeit von inorganischem Phosphat für den Calvin-Cyclus).

In dieser Arbeit wurden für verschiedene Blattstockwerke (7 und 9-10), die Änderungen der Netto-Photosyntheseraten (A_N) in Abhängigkeit von den internen CO_2 -Konzentrationen (C_i) aufgenommen. In Abb. 3.18 sind diese A/C_i -Kurven dargestellt. Bei Blattposition 7 unterscheiden sich die A_N -Werte zwischen den Wildtyppflanzen auf der einen, und den transgenen Linien auf der anderen Seite deutlich voneinander. Die Wildtyppflanzen erreichen über den gesamten Messbereich deutlich geringere A_N -Werte als die transgenen Linien, deren Werte untereinander sehr ähnlich sind. Die höchsten A_N -Werte zeigten die RNAi-PIP1-Pflanzen. Bei den höheren Blattpositionen, 9 und 10, ist dieser Unterschied nicht mehr zu sehen. Die Messwerte der drei Tabaklinien liegen hier dichter beisammen. Die Wildtyp Pflanzen weisen die niedrigsten A_N -Werte auf. Die A_N -Werte der RNAi-PIP1-Pflanzen weisen im Bereich der niedrigeren C_i -Konzentrationen (erste fünf Messpunkte, C_i von 50-200 $CO_2 \text{ mol}^{-1}$) einen steileren Anstieg als die der RNAi-PIP2-Pflanzen auf. Aus diesem Grund liegen die Werte der RNAi-PIP1-Pflanzen im vorderen Bereich zwar unterhalb derjenigen der RNAi-PIP2-Pflanzen, im Bereich der höheren C_i -Konzentrationen (ab 400 $CO_2 \text{ mol}^{-1}$) jedoch über diesen. Vergleicht man die A_N -Werte der drei Tabaklinien miteinander, so fallen bei Blattposition 7 die Werte im hinteren Bereich deutlich ab; bei den Blattpositionen 9-10 dagegen ist dies nur für die RNAi-PIP2-Pflanzen zu beobachten. Auffällig ist, dass die Daten der RNAi-PIP2-Pflanzen sehr viel breiter streuen, wie man in Abb. 3.18 sehen kann

(für beide Blattpositionen). Die Reaktion der individuellen RNAi-PIP2-Pflanzen fällt sehr unterschiedlich aus, dies sieht man sehr deutlich in Abb. C.1 im Anhang C, dort wurden die Werte der einzelnen Pflanzen dargestellt.

Für diese Messungen wurde versucht Kurvenanpassungen nach dem Modell von Farquhar et al. [Farquhar et al., 1980] (mit Hilfe des Programms Photosyn Assistant, 1.1, Dundee Scientific) vorzunehmen. In Tabelle 3.7 sind für beide Blattpositionen die Schlüsselparameter samt Fehlern ($\pm SE$) angegeben. Der Wert für V_{TPU} fehlt bei den RNAi-PIP1, und WT-Pflanzen, da bei diesen Pflanzen kein Abfall der Kurven beobachtet werden konnte. Vergleicht man die Werte der Blattpositionen 7 zwischen den Pflanzen, so sind die Standardfehler relativ klein und die Differenzen zwischen den Werten relativ groß. Die Differenzen der Werte für die Blattpositionen 9-10 liegen enger beieinander, doch auch dort sind die Standardfehler, die das Programm ausgibt relativ klein. Doch trotz der kleinen Standardfehler, sind die Kurvenanpassungen problematisch. Die Anpassungen verhalten sich sehr empfindlich gegenüber den Startwerten und es gibt bei kleinen Änderungen der Startwerte dramatische Änderungen in den Werten v.a. von $V_{c,max}$, so z.B. für die RNAi-PIP2-Pflanzen für Blattposition 9-10: in diesem Fall wurden Startwerte für R_d , $V_{c,max}$, J_{max} und V_{TPU} geschätzt und in dem Programm eingegeben. Folgende Werte ergeben sich:

Startwerte (-4, 42, 64, 5)	(-4, 43, 64, 5)	(-3.02, 119, 114, 4.11)
$R_d = -3.90$	$R_d = -3.02$	$R_d = -2.78$
$V_{c,max} = 49.5$	$V_{c,max} = 119.0$	$V_{c,max} = 81.3$
$J_{max} = 119$	$J_{max} = 114$	$J_{max} = 119$
$V_{TPU} = 4.95$	$V_{TPU} = 4.11$	$V_{TPU} = 4.90$

Die A/C_i -Kurven Regressionsanalyse erfordert eine gute *a priori* Abschätzung der C_i -Werte, an welchen sich die Schnittpunkte zwischen den verschiedenen Kurvenanteilen befinden [Long and Bernacchi, 2003, Manter and Kerrigan, 2004]. Diese Abschätzung war hier nicht immer gut, deswegen verhalten sich die Kurven so empfindlich gegenüber den Startwerten. Weiterhin fließen in das Modell viele Annahmen ein; wenige der Parameter die benötigt werden, um R_d , $V_{c,max}$, J_{max} und V_{TPU} zu bestimmen, wurden gemessen und nicht immer müssen die Annahmen zutreffen. Aus diesen Gründen wird im Folgenden darauf verzichtet, mit den bestimmten Werten für R_d , $V_{c,max}$, J_{max} und V_{TPU} zu argumentieren. Bei der Anpassung von Lichtkurven und A/C_i -Kurven ist noch anzumerken, dass es neue mathematische Verfahren gibt (non-linear mixed models) die eine genauere Fehlerabschätzung bieten, als das Verfahren, dass bei diesem Programm (Photosyn Assistant, 1.1, Dundee Scientific) angeboten wird [Peek et al., 2002].

Tabelle 3.7: Parameter der Kurvenanpassung für die Parameter der Kurvenanpassung von *N.tabacum*. Vergleich des WT und der beiden transgenen Linien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2). Angegeben sind die Parameter $\pm SE$; n=4 für Blattposition 7, n=6 für Blattposition 9-10.

Blattpos. 7	WT	RNAi-PIP1	RNAi-PIP2
R_d	-2.6 ± 0.1	-4.6 ± 0.2	-3.9 ± 0.3
$V_{c,max}$	38.1 ± 0.6	56.2 ± 1.7	49.5 ± 2.0
J_{max}	88.7 ± 1.4	131 ± 4.4	119 ± 4.7
V_{TPU}	4.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.95 ± 0.1
Blattpos. 9-10	WT	RNAi-PIP1	RNAi-PIP2
R_d	-2.2 ± 0.2	-2.3 ± 0.4	-1.67 ± 0.3
$V_{c,max}$	46.4 ± 2.1	53.3 ± 3.2	89.6 ± 3.6
J_{max}	103 ± 2.3	121 ± 4.2	119 ± 4.5
V_{TPU}	--	--	4.1 ± 1

Stomatäre Leitfähigkeiten

Betrachtet man die stomatären Leitfähigkeiten (g_s) in Abhängigkeit von den Netto-Photosyntheseraten, so zeigt sich für Blattposition 7 ein deutlicher Unterschied zwischen den Wildtypen und transgenen Linien (Abb. 3.19). Der WT weist die niedrigsten g_s -Werte auf, die RNAi-PIP1-Pflanzen die höchsten. Über den gesamten Messbereich hinweg sind die Messwerte der Wildtypen im Rahmen der Fehlergenauigkeit nicht gleich mit denen der beiden transgenen Linien. Die Werte der transgenen Linien dagegen stimmen überein. Für Blattposition 9-10 ergibt sich für den unteren Messbereich der Kurven (erste sechs Messwerte: C_i -Werte von 50-400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) ein ähnliches Bild: die Wildtyppflanzen haben deutlich höhere g_s -Werte als die transgene Pflanzen, deren Werte wieder näher beieinander liegen und innerhalb ihrer Fehlergrenzen übereinstimmen. Die Werte der RNAi-PIP2-Pflanzen fallen stärker ab als die der RNAi-PIP1-Pflanzen (erste fünf Messwerte: C_i von 50-200 $\text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), deswegen sind in diesem Bereich die g_s -Werte der RNAi-PIP2-Pflanzen niedriger als die der RNAi-PIP1-Pflanzen. Im Bereich der höheren C_i nähern sich alle Werte einander an, dort sind die Werte der RNAi-PIP1-Pflanzen die niedrigsten. Die g_s -Werte der WT und RNAi-PIP1-Pflanzen stimmen jedoch auch in diesem Bereich nicht überein. Es ergibt sich also für die stomatären Leitfähigkeiten ein identisches Bild zu den A/C_i -Kurven, d.h. die niedrigeren Photosyntheseraten des WT gegenüber den Transgenen liegt in den niedrigeren stomatären Leitfähigkeiten des WT begründet.

3.4.2 Fluoreszenzmessungen

Neben den Gaswechsellmessungen wurden parallel Fluoreszenzmessungen an den gleichen Blättern durchgeführt (siehe Kap. 2.5.1 und Abb. 2.6),

Elektronentransportraten des PSII

In Abb. 3.20 sind die Elektronentransportraten (ETR) in Abhängigkeit von den C_i -Konzentrationen gezeigt. Die Werte der Pflanzen sind sehr ähnlich, man

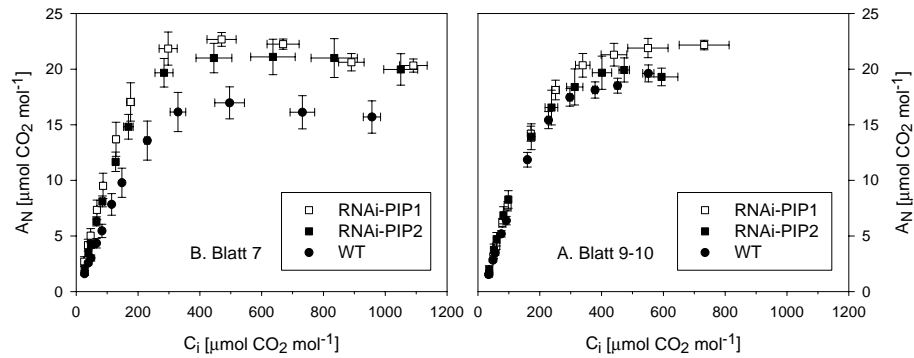


Abbildung 3.18: A/C_i -Kurven der verschiedenen Tabaklinien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2, WT). Es wurde zum einen die siebte Blattposition gemessen (MW \pm SE, n=4), zum anderen das jeweils größte Blatt der Pflanze (Blattposition 9-10, MW \pm SE, n=6). Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung 35 bis 39 Tage alt.

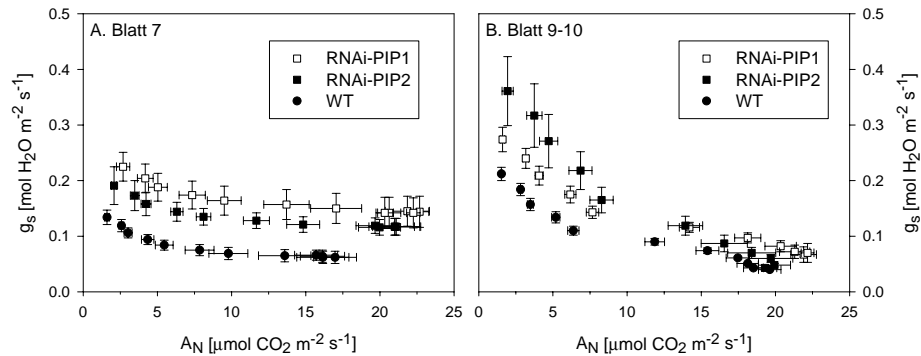


Abbildung 3.19: Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeiten (g_s) von den Netto-Photosyntheseraten (A_N) der verschiedenen Tabaklinien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2, WT). Es wurde zum einen die siebte Blattposition gemessen (MW \pm SE, n=4), zum anderen das jeweils größte Blatt der Pflanze (Blattposition 9-10, MW \pm SE, n=6). Die Daten der stomatären Leitfähigkeiten erhält man aus derselben Gaswechsellmessung wie die Daten der obigen A/C_i -Kurve, siehe Abb. 3.18.

sieht keinen Unterschied zwischen den Elektronentransportraten. Im Bereich der ersten fünf Messwerte (C_i -Werte von 50-200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) ist die Steigung der ETR-Werte der RNAi-PIP2-Pflanzen etwas steiler als die der Wildtyppflanzen; aber ein deutlicher Unterschied zwischen den Pflanzen, ist auch in diesem Bereich der Messung nicht zu erkennen. Die Elektronentransportraten der RNAi-PIP2-Pflanzen liegen etwas höher als die der RNAi-PIP1-, bzw. Wildtyppflanzen, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

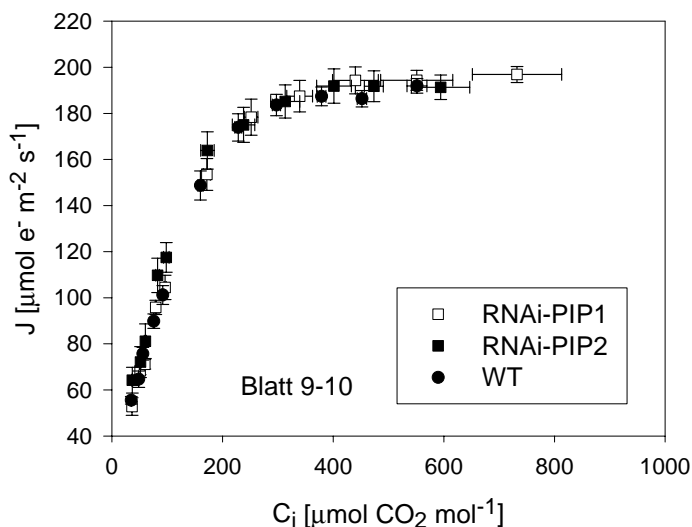


Abbildung 3.20: Elektronentransportraten (ETR) der verschiedenen Tabaklinien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2, WT) in Abhängigkeit von den internen CO_2 -Konzentrationen (C_i). Es wurde das jeweils größte Blatt der Pflanze parallel zu den Gaswechselanalysen gemessen (Blattposition 9-10, MW \pm SE, n=6).

Nicht-photochemisches Quenching

In Abb. 3.21 sind die NPQ-Werte der drei Tabaklinien in Abhängigkeit von den C_i -Konzentrationen gezeigt. Im Bereich der niedrigen C_i -Konzentrationen (erste fünf Messpunkte, 50-200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), liegen die NPQ-Werte der Wildtyppflanzen unterhalb derjenigen der RNAi-PIP1-Pflanzen. Im Bereich der höheren C_i -Konzentrationen (ab 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) nähern sich die Messpunkte der Linien einander an. Die beobachteten Unterschiede sind bei dieser kleinen Stichprobengröße jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine Unterschiede bezüglich den Elektronentransportraten in Abhängigkeit von den C_i -Konzentrationen zwischen den Pflanzen gibt, aber geringe Unterschiede in den NPQ-Werten, zumindest im Bereich der niedrigen C_i -Konzentrationen (50-200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) zwischen dem WT und den RNAi-PIP1-Pflanzen.

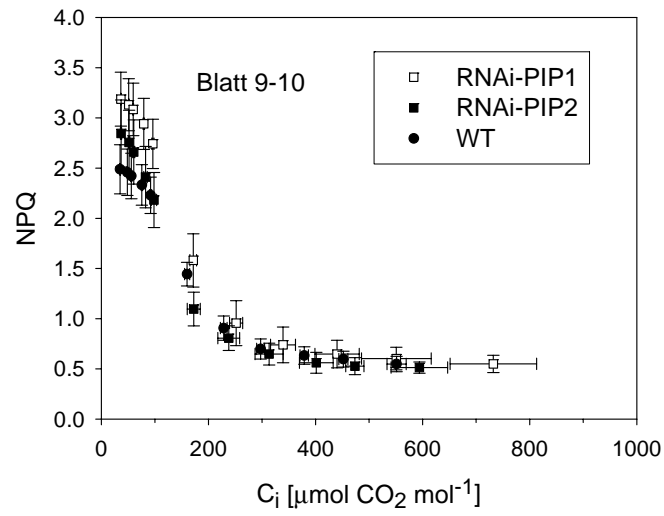


Abbildung 3.21: Nicht-photochemisches Quenching (NPQ) der verschiedenen Tabaklinien (RNAi-PIP1, RNAi-PIP2, WT) in Abhängigkeit von den internen CO_2 -Konzentrationen (C_i). Es wurde das jeweils größte Blatt der Pflanze parallel zu den Gaswechselanalysen gemessen (Blattposition 9-10, MW \pm SE, n=6).

3.5 Kinetik des Keimungsprozesses

Aus den Wachstumsanalysen konnte eine zeitliche Verschiebung der Wachstumskurven des Wildtypen gegenüber den transgenen Pflanzen festgestellt werden. Ursache für diese Verschiebung könnte ein unterschiedlicher Keimungszeitpunkt sein, deswegen wurde in einem Experiment die Keimungskinetik des Wildtypen und der transgenen Pflanzen untersucht. Samen des WT und der RNAi-PIP1- und RNAi-PIP2-Pflanzen wurden hierzu in Petrischalen auf einer doppelten Lage Filterpapier, bei 23°C und kontinuierlichem Licht, ausgelegt und unter dem Binokular beobachtet. Die Versuche erfolgten nicht auf Erde, da zum einen die Keimungsereignisse vor dem dunklen Hintergrund schlechter erfasst werden können, zum anderen, um eine bessere Kontrolle der Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Auf Erde können Parameter wie z.B. Feuchte kleinräumig stark schwanken. Eine Aufnahme einer Testaruptur unter dem Binokular ist in Abb. 3.22 gezeigt.

In Abb. 3.25 ist die Kinetik der Testa- und Endospermruptur dargestellt. Die Anpassungen der Kurven wurden nach Weibull [Brown and Mayer, 1988] vorgenommen. Die zugehörige Gleichung, für beide Keimungsphasen, lautet:

$$f(t) = a * (1 - e^{\frac{-|t - t_0 + b * \sqrt[n]{\ln(2)}|^c}{b}}) \quad (3.5)$$

dabei bezeichnet a die maximale Keimungsrate innerhalb des untersuchten Zeitraumes, b die Steigung der Kurve, c einen Formparameter, und t_0 den Beginn der Testa-, bzw. Endospermruptur in Stunden. In Tab. 3.8 und 3.9 sind die Werte dieser Parameter für die Testa-, bzw. die Endospermruptur aufgelistet; in Abb. 3.23 und 3.24 entsprechend die Parameter mit ihren Konfidenzintervallen.

Unterschiede bezüglich der Testaruptur

Zwischen den Samen gibt es einen signifikanten Unterschied (p-Wert < 0.01) bezüglich des Beginns der Testaruptur (t_0); die Konfidenzintervalle überschneiden sich nicht (kritischer t-Wert für $n = 5$ und $C = 99\%$ ist 4.607): die RNAi-PIP2-Samen keimen am schnellsten, nach ca. 36 ± 0.2 Stunden. Die WT-Samen keimen ca. 3.5 Stunden später, nach 39.6 ± 0.3 Stunden, und die RNAi-PIP1-Samen brauchen nochmals 7 Stunden länger als der Wildtyp, sie keimen nach ca. 46 ± 0.2 Stunden. Die maximalen Keimungsraten (a) der Samen sind etwas unterschiedlich: während WT und RNAi-PIP1-Samen mit der gleichen Rate keimen ($91.5\% \pm 1.8$, bzw. $92.8\% \pm 1.1$), liegt diese bei den RNAi-PIP2-Samen niedriger ($85\% \pm 1.1$); dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (kritischer t-Wert für $n = 5$, $C = 95\%$ ist 2.777) nachzuweisen, siehe Abb. 3.23. Es lässt sich nicht mit letzter Sicherheit bestimmen, ob derjenige Anteil der Samen, der hier fehlt, wirklich nicht mehr keimfähig ist oder nicht. Auffällig ist dieser geringere Anteil dennoch; entweder ist die Keimfähigkeit der Samen dieser Population wirklich geringer, oder aber, dieser Anteil keimt extrem zeitverzögert.



Abbildung 3.22: Testaruptur (nach ca. 46 Stunden) von *N. tabacum*: RNAi-PIP1-Same unter dem Binokular. Der Pfeil deutet auf die gerissene Testa im Bereich der Mikropyle.

Tabelle 3.8: Keimungsversuch auf Filterpapier in Petrischalen. Kinetik der Testaruptur bei *N. tabacum*: WT, RNAi-PIP1- und RNAi-PIP2-Samen. Verwendete Formel 3.5 siehe Text; angegeben sind die Parameter der Kurvenanpassung \pm SE.

Parameter	RNAi-PIP2	WT	RNAi-PIP1
a	85.0120 ± 1.0475	91.4584 ± 1.7943	92.7477 ± 1.0879
b	5.0596 ± 0.9313	5.8170 ± 0.4988	10.4673 ± 0.4412
c	0.6224 ± 0.0942	0.9633 ± 0.1273	0.9459 ± 0.0586
t_0	35.8286 ± 0.2173	39.5524 ± 0.2629	46.1480 ± 0.2179

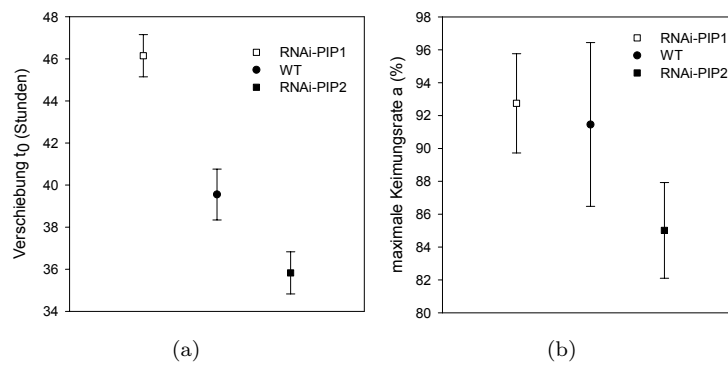


Abbildung 3.23: Testaruptur: Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter t_0 und a , die aus der Kurvenanpassung (Formel 3.5 siehe oben) ermittelt wurden. a.) Verschiebung $t_0 \pm 99\%$ CIs , b.) maximale Keimungsraten $a \pm 99\%$ CIs

Endospermruptur

Betrachtet man die Endospermruptur, so ergibt sich ein ähnliches Bild: auch hier gibt es eine signifikante (p-Wert < 0.01), zeitliche Verschiebung (Abb. 3.24, kritischer t-Wert für $n = 5$ und $C = 99\%$ ist gleich 4.609). Die RNAi-PIP2-Samen sind ca. 5.5 Stunden schneller als der WT und ca. 10 Stunden schneller als die RNAi-PIP1-Samen. Bei den RNAi-PIP2-Samen erfolgt die Endospermruptur nach ca. 48.5 ± 0.04 Stunden, bei den WT nach ca. 54 ± 0.4 Stunden und bei den RNAi-PIP1-Samen nach ca. 60 ± 0.1 Stunden. Der zeitliche Unterschied zwischen den verschiedenen Samen, bleibt für beide Phasen ungefähr gleich groß: d.h. sowohl Testa-, als auch Endospermruptur liegen bei den RNAi-PIP1-, und RNAi-PIP2-Samen ca. 10 Stunden auseinander, zwischen WT- und RNAi-PIP1-Samen beträgt diese Differenz ca. 7, bzw. 6 Stunden und zwischen den WT- und RNAi-PIP2-Samen ca. 3.5, bzw. 5.5 Stunden. Unterschiedlich ist in dieser Phase auch der Anteil derjenigen Samen, die diese Phase erreichen: bei den WT- und RNAi-PIP1-Samen ist dieser Anteil annähernd gleich ($93\% \pm 1$, bzw. $93.4\% \pm 1.4$), für die RNAi-PIP2-Samen liegt dieser Anteil niedriger ($87.9\% \pm 0.8$); dieser Unterschied konnte jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden.

Tabelle 3.9: Keimungsversuch auf Filterpapier in Petrischalen. Kinetik der Endospermruptur bei *N.tabacum*: WT, RNAi-PIP1- und RNAi-PIP2-Samen. Verwendete Formel 3.5 siehe Text; angegeben sind die Parameter der Kurvenanpassung \pm SE.

Parameter	RNAi-PIP2	WT	RNAi-PIP1
a	87.9216 ± 0.8064	92.9752 ± 1.0299	93.4338 ± 1.4039
b	1.7501 ± 0.0916	8.1739 ± 1.7784	4.9200 ± 0.4822
c	0.3207 ± 0.0154	1.0020 ± 0.2493	0.4803 ± 0.0556
t_0	48.5302 ± 0.0366	53.6719 ± 0.3518	59.8863 ± 0.1128

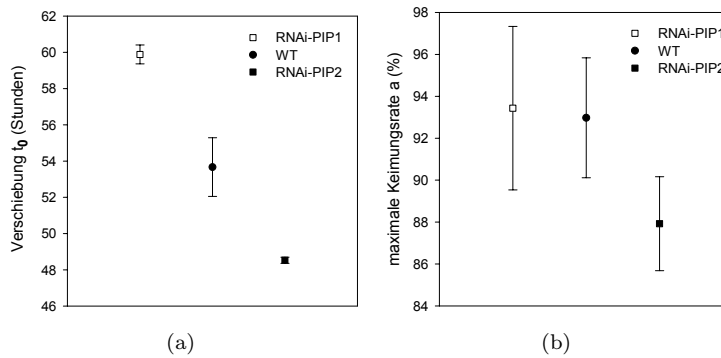


Abbildung 3.24: Endospermruptur: Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter t_0 und a , die aus der Kurvenanpassung (Formel 3.5 siehe oben) ermittelt wurden. a.) Verschiebung $t_0 \pm 99\%$ CIs, b.) maximale Keimungsraten $a \pm 99\%$ CIs

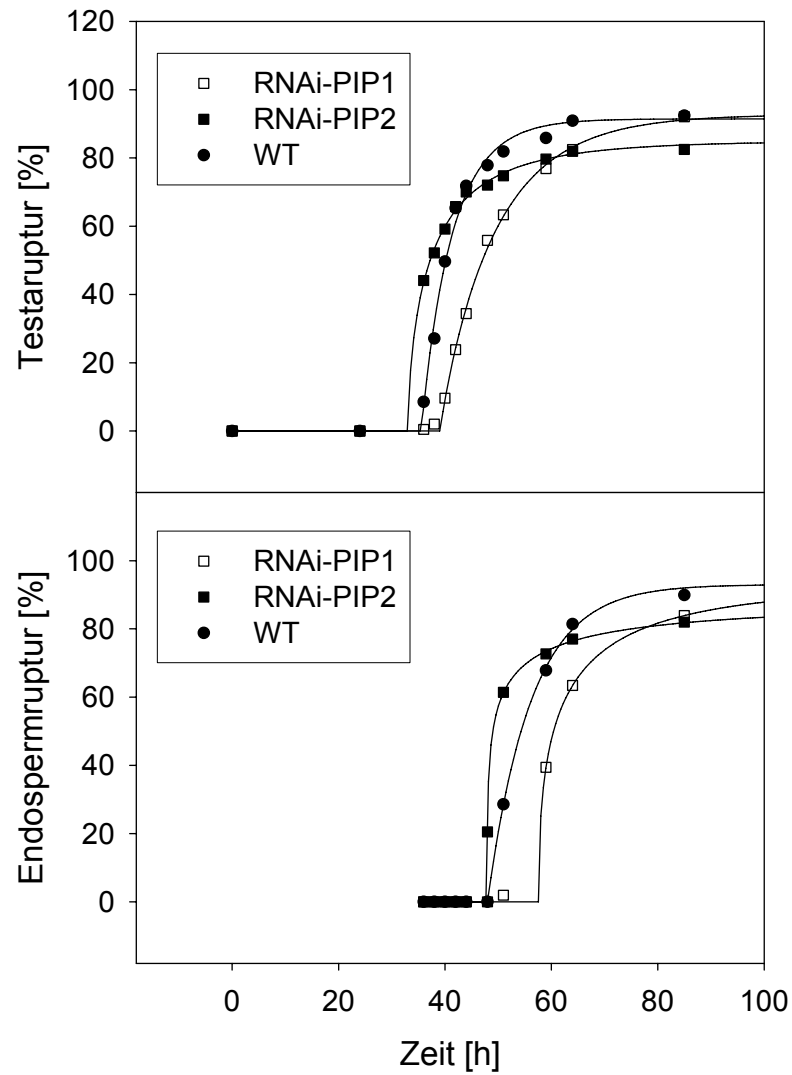


Abbildung 3.25: Keimungskinetik von *N. tabacum*: Wildtyp-, RNAi-PIP1-, und RNAi-PIP2-Samen im Vergleich. Keimungsversuch auf Filterpapier in Petrischalen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Samen in der jeweiligen Phase. Fünf Ansätze pro transgener Linie, bzw. WT, und je 40 Samen pro Ansatz, wurden unter dem Binokular ausgezählt ($n=5$). Die Kurven wurden nach Weibull [Brown and Mayer, 1988] angepasst: Formel 3.5 siehe Text; Parameter der Kurvenanpassung \pm SE siehe Tab. 3.8 und Tab. 3.9.

Kapitel 4

Diskussion

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit war, ob PIP1 und PIP2 maßgeblich am Expansionswachstum der Blätter beteiligt sind. Das dahinterstehende Modell geht davon aus, dass PIP1 und PIP2 für die Deckung des erhöhten Wasserbedarfs während des Expansionswachstums der Blätter verantwortlich sind. Dies hat sich im Rahmen der Wachstumsuntersuchungen nicht bestätigt, der Haupteffekt beim Wachstum war eine Verzögerung des Eintritts in die Wachstumsphase, mit anderen Worten die transgenen Pflanzen keimten zu einem späteren Zeitpunkt als der WT, bzw. die Kontrollpflanzen. Nach der Keimung war die Wachstumsdynamik der transgenen Pflanzen im Prinzip dieselbe wie beim WT, bzw. den Kontrollpflanzen, sowohl was den Verlauf, als auch die ermittelten Endblattflächen betrifft. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die PIP1 und PIP2 während des Wachstums der Blätter neben einer Erhöhung der Wasserleitfähigkeit der Membran andere Aufgaben erfüllen. Es gibt einen Ansatz von Hill et al. [Hill et al., 2004], der eine weitere Funktion der Aquaporine als Turgordrucksensoren vorschlägt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten in einigen Punkten eher auf eine Druckregulierung im Sinne von Hill et al. [Hill et al., 2004], so etwa die Ergebnisse der Screening-Untersuchungen was die Blattbewegungen betrifft, die verzögerte Keimung der RNAi-PIP1-Pflanzen oder die eingeschränkte Stomatabewegung der transgenen Pflanzen.

4.1 Dynamik des Blattwachstums

Zeitliche Entwicklung der Gesamtblattflächen: *N.tabacum*

Der größte Effekt bei der Analyse der Blattflächenentwicklung der WT-, und RNAi-PIP1-Pflanzen unter Gewächshausbedingungen ergab sich aus der zeitlichen Verschiebung der Kurven gegeneinander: die Kurven der Pflanzen lagen ca. einen halben Tag auseinander (siehe Abb.3.7, Tab.3.3), wobei die Kurve der RNAi-PIP1-Pflanzen gegenüber dem WT nach rechts verschoben ist. Dies deutet daraufhin, dass die RNAi-PIP1-Pflanzen ca. einen halben Tag später keimten als die WT-Pflanzen. Allerdings konnte aufgrund der zu kleinen Stichprobenanzahl der Pflanzen dieser Unterschied nicht signifikant nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnten signifikante Unterschiede zwischen den Endblattflächen und dem Parameter b festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Pflanzen mit der gleichen Dynamik gewachsen sind. Eine frühere Keimung bedeutet eine

frühere Entfaltung der Kotyledonen und damit sind diese beim ersten Screenen entsprechend größer als die der RNAi-PIP1-Pflanzen. Die WT-Pflanzen behalten den Vorsprung von ca. einem halben Tag über den gesamten Entwicklungszeitraum bei.

Unter den Klimakammerbedingungen war es nicht möglich, den gesamten Entwicklungszeitraum des Blattwachstums beim Tabak zu verfolgen, deswegen wurde, um den Anfang einer sigmoiden Wachstumskurve zu beschreiben, eine exponentielle Kurvenanpassung gewählt. Wegen des vorangegangenen Versuchs unter Gewächshausbedingungen wurden die Endblattflächen als gleich angenommen (siehe Kapitel 3.3.2). Der größte Effekt auf das Wachstum ist eindeutig wieder in einer zeitlichen Verschiebung der Kurven der transgenen Pflanzen gegenüber derjenigen der WT zu sehen; diese Verschiebung beträgt ist nun signifikant nachweisbar und beträgt ca. 1-2 Tage, wobei die Kurven der transgenen Pflanzen gegenüber den WT-Kurven nach rechts verschoben sind (siehe Abb. 3.10, Tab. 3.4). Die Wachstumsgeschwindigkeiten der transgenen Pflanzen sind unter diesen Bedingungen geringfügig, aber signifikant größer als die der WT-Pflanzen, jedoch wirkt sich dies nicht wesentlich auf den Kurvenverlauf aus: die Kurve der WT-Pflanzen liegt trotz der leicht geringeren Wachstumsgeschwindigkeiten deutlich oberhalb derjenigen der transgenen Pflanzen. Betrachtet man die Werte für b in Tab. 3.4, so sind diese Werte zwar signifikant unterschiedlich, dieser Effekt übt jedoch während dieser Phase des Wachstums, die durch dieses Modell beschrieben wird, geringere Auswirkungen auf das Blattwachstumsverhalten aus als die Keimungsverzögerung der transgenen Pflanzen.

Zeitliche Entwicklung der Gesamtblattflächen: *A.thaliana*

Für die Blattflächenentwicklung bei den *A.thaliana* T-DNA-Mutanten ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die Tabak RNAi-PIP-Pflanzen: der größte Effekt eines knock-outs von AtPIP1;2 zeigte sich in einer zeitlichen Verschiebung der Kurven, also einer späteren Keimung der TEPIP1;2 Pflanzen gegenüber den Kontrollen (Abb. 3.15, Abb. 3.16). Die Kontrollpflanzen keimten ca. einen halben Tag früher als die die knock-out Pflanzen. Ähnlich wie beim Tabak (siehe oben Kapitel 4.1) unterschieden sich die Werte von b der Kontrollpflanzen (TI-PIP1;2) signifikant von denen der TEPIP1;2-Pflanzen, die Wachstumsgeschwindigkeiten der Kontrollpflanzen waren größer. Dies liegt jedoch nicht daran, dass sie entscheidend unterschiedlich voneinander sind, sondern an dem sehr kleinen Standardfehler. Der Effekt, den das Keimungsverhalten auf das Wachstum ausübt, ist größer. Die Gesamtblattflächen der T-DNA-Insertionsmutanten waren unter diesen Versuchsbedingungen gleich.

Einfluss von PIP1 und PIP2 auf das Expansionswachstum der Blätter

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die größten Effekte auf das Gesamtblattwachstum sowohl beim Tabak als auch bei den *Arabidopsis*-Pflanzen in einer signifikanten, zeitlichen Verschiebung der Wachstumskurven der transgenen Pflanzen gegenüber dem WT (beim Tabak), bzw. den Kontrollpflanzen (bei *Arabidopsis*) zu sehen sind und damit wahrscheinlich in einem unterschiedlichen

Keimungsverhalten der Pflanzen begründet sind. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Wachstumsanalysen ein Keimungsversuch durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen (siehe Kapitel 2.6, und 3.5).

Ein Effekt auf das Blattwachstumsverhalten der transgenen Pflanzen in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit, ihre Wachstumsdynamik also, ist weder bei den Tabaklinien noch bei den *Arabidopsis*-Pflanzen, deutlich ausgeprägt. Die Unterschiede sind, wenn überhaupt vorhanden, sehr klein und treten gegenüber dem Einfluss auf die Keimungskinetik deutlich zurück. Ebensowenig gibt es einen Effekt auf die Endblattflächen der transgenen Pflanzen.

Da sich sehr geringe Auswirkungen auf die Gesamtblattflächenentwicklung der transgenen Tabaklinien im Vergleich zum Wildtypen unter optimalen Bedingungen ergeben, stellt sich die Frage, welche physiologische Bedeutung sie für das Expansionswachstum besitzen. Falls die PIPs das Expansionswachstum hauptsächlich über die Wasserleitfähigkeiten der Plasmamembranen beeinflussen, sollte man bei den transgenen Tabakpflanzen, bzw. den TEPIP1;2 Pflanzen veränderte Wachstumsgeschwindigkeiten erwarten; sie sollten dem WT, bzw. den Kontrollpflanzen gegenüber geringer sein. Dies war jedoch nicht der Fall. Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, dass das System ausweicht und Möglichkeiten findet, die Defekte auszugleichen. Vielleicht sind die PIP1-, und PIP2-Proteine in der Lage jeweils die Funktion der anderen in einem gewissen Maße zu übernehmen, so dass sich aus diesem Grund keine großen Wachstumsunterschiede ergeben. Eine andere Erklärung liegt vielleicht in einer anderen Funktion der Aquaporine. Weitere mögliche Funktionen der Aquaporine werden von Hill et al. [Hill et al., 2004] vorgeschlagen. Neben einer Wassertransport-Funktion wird eine Funktion der Aquaporine bei der Detektion von osmotischen und Turgordruckgradienten diskutiert [Hill et al., 2004]. So könnten sie auch bei der Kontrolle des Expansionswachstums eine Rolle spielen, indem sie Änderungen im Turgordruck wahrnehmen und diese Information intrazellulär weitergeben. Im Rahmen dieser Arbeit scheint es eher für diese Hypothese Hinweise zu geben.

Wachstum ist ein „Quasi“-Gleichgewichtszustand. Wenn das Zellwandwachstum konstant beginnt, bedingt dies ein Anwachsen der Wandflächen und infolge dessen fällt der Turgor ab. Die einwärtsgerichtete, treibende Kraft für H_2O steigt und Wasser fließt in die Zelle. Gleichzeitig kehrt der Turgor zu seinem ursprünglichen Wert zurück. Der Wert des Turgors im Gleichgewicht ist unabhängig von der Zellwandfläche und der Wandelastizität. Die Autoren nennen zwei mögliche Rückkopplungsschleifen zwischen Wachstumsraten und Turgor:

- i Falls die Wachstumsrate nicht kontrolliert wird, wird sich der Turgor infolge der Wachstumsrate ändern und damit wird die treibende Kraft für die Expansion nicht konstant bleiben. Damit der Turgor jetzt aber unabhängig vom Wachstum ist, sollte die Salzkonzentration abgestimmt sein auf die Wachstumsrate. Wächst also die Zelle \rightarrow vergrößert sich das Volumen \rightarrow der Turgor fällt \rightarrow Osmolyte werden in die Zelle gepumpt \rightarrow Wasser fließt nach. Der Turgor bleibt dann relativ konstant bei einem lokalen Wert. Der Tonoplast ist in dieses System wahrscheinlich ebenfalls involviert, da die Vakuole Depot ist für den größten Teil des Zellvolumens.
- ii Die Wandexpansion könnte aber auch mit dem Turgor koordiniert sein, um eine Ausdünnung bei zu großem Druck und umgekehrt eine zu starke Wand

bei zu kleinem Druck zu verhindern. Dies erfordert eine Rückkopplung mit einem Drucksensor.

Nach diesem Model von Hill et al. wirken also Aquaporine bei der Turgorregulation wie eine Art Druckventile: wenn der Turgor zu stark ansteigt, lassen sie Druck ab, wenn er zu niedrig ist, bewirken sie über eine Rückkopplung mit anderen Teilen des Systems, dass gelöste Stoffe verschoben werden und Wasser in die Zelle fließt. Insofern sollte man bei Reaktionen die eine Turgorregulation erfordern, eine Beteiligung von Aquaporinen erwarten, falls diese den Ionen-transport triggern. Hinweise für eine Turgorregulation finden sich bei den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit. Auch das Expansionswachstum erfordert eine Druckregulation, wie auch der Keimungsvorgang oder die Stomataregulation.

Unterschiede der Blattflächen in Abhängigkeit von der Blattposition bei *N.tabacum*

Aus den Linealmessungen war es möglich die Blattflächen einzelner Blattpositionen zu vergleichen. Dies wurde für den 28. Tag nach der Keimung durchgeführt. Dabei fanden sich signifikante Unterschiede in Blattposition 5 und 6; bei allen höheren Blattpositionen war dieser Effekt schwächer und konnte mit dieser Stichprobengröße nicht signifikant nachgewiesen werden. Die Blattflächen der RNAi-PIP1-Pflanzen waren kleiner als die der WT-Pflanzen. Für das Ende des Entwicklungszeitraumes schwächt sich auch bei Blattposition 6 dieser Effekt ab, da die Varianzen größer werden. Der Versuch wurde in dem Zeitraum April-Mai im Gewächshaus durchgeführt, zu einem Zeitpunkt zu dem die Sonneneinstrahlung z.T. schon recht stark war. Morgens nach dem Sonnenaufgang und Einschalten der Lampen ließ sich beim Tabak beobachten, dass die unteren Blätter oft ein wenig welkten (der Tabak beginnt in den unteren Blattpositionen zuerst zu welken). Im Laufe des Vormittages erholten sich die Blätter und der Turgor in den Blättern stieg wieder. Der gemessene Unterschied in den Blattflächen ist auf diesen Turgorverlust zurückzuführen. Dies würde bedeuten, dass die RNAi-PIP1-Pflanzen größere Schwierigkeiten haben ihren Turgor zu regulieren, was sich in einem stärkeren Welken der Blätter äußert. Die Blätter erholen sich wieder und die Gesamtblattflächenentwicklung wird dadurch wenig beeinflusst: die Endblattflächen der Pflanzen zeigten keine Unterschiede. Die Dynamik des Wachstums, also die Wachstumsraten, waren ebenfalls nicht unterschiedlich.

Aus den Untersuchungen zeigt sich, dass es räumliche Unterschiede zwischen dem WT und den transgenen Linien gibt (siehe Kapitel 3.3.1, Abb. 3.9). Vor allem für die unteren Blattpositionen 5 und 6 ist dieser Unterschied in den Blattflächen nachzuweisen für den 28. Tag nach der Keimung. Die kleineren Blattflächen der RNAi-PIP1-Pflanzen sind zurückzuführen auf Unterschiede im Turgor; am Morgen haben die unteren Blätter dieser Pflanzen gegenüber den Blättern der WT-Pflanzen einen geringeren Turgor, der sich im Laufe des Tages wieder erholt. Dieser Effekt wirkt sich langfristig nicht auf die Wachstumsraten aus (bezogen auf die Gesamtblattflächenentwicklung). Dieser Effekt wird zu den oberen, jüngeren Blattpositionen hin schwächer. Diese Unterschiede spiegeln sicherlich auch die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wieder; vielleicht ist die Konzentration der PIP-Proteine in den unteren Blättern während

der Messzeiten höher gewesen als in den oberen Stockwerken, so dass sich ein Fehlen dieser dort stärker auswirkt. Die Proteinkonzentration des NtAQP1 variiert zum einen diurnal [Siefritz et al., 2004], zum anderen aber auch zwischen den Geweben [Siefritz et al., 2004] und innerhalb der Gewebe [Fritsch, 2005]. So gibt es in den oberen Blattstockwerken einen Basis-Spitze Gradienten, mit einer zur Blattspitze hin abfallenden Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration steigt mit dem Alter der Blätter an, d.h. in den unteren Blättern wurde eine höhere Proteinkonzentration gefunden (bei Proben die Nachmittags genommen wurden) [Fritsch, 2005]. Die Unterschiede bei den Blattflächen der RNAi-PIP1-Pflanzen und den WT-Pflanzen zeigen also Unterschiede in der Einstellung des Turgors, was für eine Beteiligung der PIP1-Proteine an einer Turgorregulation der Pflanzen spricht.

Auswirkungen einer reduzierten Expression von NtAQP1, bzw. Nt-AQP2 auf die Blattbewegung

In dieser Arbeit konnten Unterschiede im Tagesgang der Blattbewegung mit Hilfe der Screening-Methode festgestellt werden. Aus dem Vergleich der Zuwachsraten, die über verschiedene Messmethoden ermittelt worden sind (Screening vs. Linealmessungen), zeigt sich, dass sowohl die Blattbewegung, als auch die Zuwachsraten der 17 Tage alten Tabakpflanzen unterschiedlich sind (siehe Kapitel 3.2, Tab.3.1).

Nach den Linealmessungen sind weder WT noch RNAi-PIP2-Pflanzen zwischen 11 und 15 Uhr gewachsen (Zuwachsrate $\pm 0\%$), die RNAi-PIP1-Pflanzen jedoch ca. 20% ¹. Aus den Screeningdaten geht dagegen hervor, dass WT und RNAi-PIP2-Pflanzen während dieses Zeitraumes um ca. 8%, bzw. 13% zugewachsen sind, und die RNAi-PIP1-Pflanzen um ca. 11%. Daraus lässt sich schließen, dass die Blätter der WT- und RNAi-PIP2-Pflanzen sich während dieses Zeitraumes gesenkt haben (Anstellwinkel verringern sich, die projizierte Blattfläche wird damit größer), die Blätter der RNAi-PIP1-Pflanzen sich dagegen gehoben haben (Anstellwinkel vergrößern sich, die projizierte Blattfläche wird kleiner). Dies bedeutet, dass sich RNAi-PIP2-Pflanzen und der WT in der gleichen Weise bewegen, aber konträr zu den RNAi-PIP1-Pflanzen. Die Blattbewegung liegt ungefähr in der gleichen Größenordnung; dies kann aus dem systematischen Fehler von ca. 10 % für die Screeningmessungen geschlossen werden.

Weiterhin zeigt die Linealmessung, dass diese konträre Blattbewegung einhergeht mit einer anderen Zuwachsrate: die RNAi-PIP1-Pflanzen wachsen in dieser Zeit ($\pm 20\%/4h$), während WT und RNAi-PIP2-Pflanzen keinen Zuwachs ($\pm 0\%/4h$) zeigen: heben sich die Blätter, steigt der Turgor und der Zuwachs ebenso, senken sich die Blätter, sinkt der Turgor und kein Zuwachs wird gemessen. Leider wurde nur für diesen Entwicklungszeitpunkt der Pflanzen eine kombinierte Screening- und Linealmessung gemacht, zudem konnten nur wenige Pflanzen mit dem Lineal vermessen werden. Völlig ausgeschlossen werden kann nicht, dass auch die RNAi-PIP2-Pflanzen Unterschiede zum WT zeigen, um dies besser beurteilen zu können, wäre eine höhere Stichprobengröße bei den Linealmessungen nötig gewesen. Jedoch lässt sich festhalten, dass das Fehlen der PIP1-Proteine einen Unterschied im diurnalen Rhythmus der Blattbewegung und der damit verbundenen Wachstumsraten bewirkt (zumindest für diesen

¹Da das Gesamtwachstum während eines Tages nicht, bzw. nur unwesentlich unterschiedlich ist, handelt es sich hierbei lediglich um ein im Tagesverlauf verschobenes Wachstum.

Zeitpunkt der Entwicklung). Um diese Unterschiede in den Zuwachsraten besser aufzulösen, wären DISP-Messungen nötig gewesen. Doch leider war es nicht möglich die DISP-Messungen auszuwerten (siehe Kapitel 3.3.3). Betrachtet man die Einzelmessungen (siehe Abb. 3.12, Abb. 3.13), so könnte es gerade in der Nacht und an den Übergängen von Licht zu Dunkel Unterschiede geben. Abb. 3.12 deutet vielleicht auch eine Phasenverschiebung der kleineren Maximums am Mittag an, doch schon in Abb. 3.13 ist dies nicht mehr gut zu erkennen. Eine Quantifizierung dieser Daten war zu diesem Zeitpunkt aus methodischen Gründen nicht möglich (siehe Kapitel 3.3.3). Um die Frage einer Turgorregulierung durch PIP-Proteine während des Wachstums zu klären, wäre es wichtig Wachstums- und Turgormessungen zu kombinieren. Wenn PIP-Proteine Turgorunterschiede detektieren und diese Information intrazellulär an andere Elemente des Systems weiterleiten, hier aber bei den RNAi-Pflanzen jeweils eine Komponente (PIP1-, bzw. PIP2-Proteine) fehlt, kann man erwarten, dass der Turgor schlechter konstant gehalten werden kann, er also größeren Schwankungen unterworfen ist, bzw. sich der konstante lokalen Wert schlechter einstellen kann (Überschießen des Systems, bzw. stärkere Abfälle). Dies sollte sich auch in den Wachstumsmessungen widerspiegeln. Für die RNAi-PIP1-Pflanzen ist vielleicht ebenfalls eine Phasenverschiebung der Wachstumsmaxima,- bzw. minima zu erwarten, da NtAQP1 eine sich diurnal ändernden Expression zeigt [Siefritz et al., 2004] und die Screening-Messungen dieser Arbeit eine veränderte Blattbewegung der RNAi-PIP1-, gegenüber den RNAi-PIP2-, und WT-Pflanzen gezeigt haben.

Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen an NtAQP1 antisense-Tabakpflanzen, bei denen die Änderungen der Blattanstellwinkel im Tages-, und Nachtverlauf gemessen wurden [Siefritz et al., 2004]. Die Änderungen der Blattanstellwinkel zeigten bei den antisense-Pflanzen geringere Unterschiede im Vergleich zum Wildtypen [Siefritz et al., 2004]. Die Differenz zwischen dem maximalen und minimalen Anstellwinkeln war bei den WT-Pflanzen größer als bei den antisense-Pflanzen. Vor allem während der Nacht veränderten die antisense-Pflanzen weniger stark ihre Anstellwinkel im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die NtAQP1 Expression in den Petiolen der Blätter variiert diurnal und korreliert mit der Entfaltung der Blätter. Die Genaktivität wird durch GA und ABA reguliert [Siefritz et al., 2001]. Das epinastische Wachstum während des Entfaltens der Blätter könnte durch GA- und/oder ABA induzierte Prozesse, die auch Ionentransport über das Plasmalemma einschließen reguliert werden. Aquaporine spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Blattentwicklung, indem sie die Wasserleitfähigkeiten der Membranen verändern oder den Turgor des Symplasten regulieren [Siefritz et al., 2004].

Nach der Turgorsensing-Hypothese von Hill et al. [Hill et al., 2004] sollte sich ein Fehlen von PIP-Proteinen auf die Blattbewegung auswirken: wenn die Druckregulation unterdrückt ist, sollte nur eine eingeschränkte Bewegung erfolgen können, denn Bewegungen erfordern einen schnellen Druckausgleich. Dies ist der Fall bei den NtAQP1 antisense-Tabakpflanzen [Siefritz et al., 2004]; ob dies bei den RNAi-PIP1-Pflanzen ebenfalls so ist, lässt sich nur vermuten, da nicht die Blattanstellwinkel gemessen wurden. Der Rythmus des Wachstums ist jedoch ebenfalls anders im Vergleich zum WT wie auch bei den NtAQP1 antisense-Tabakpflanzen. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls in Richtung einer

Turgorregulierung durch PIP1-Proteine beim Tabak.

DISP-Messungen: Wachstumsdynamik im Tagesverlauf einzelner Blätter

Im Anschluß an die Messungen der Gesamtblattflächenentwicklung des Tabaks, wurden weiterhin Analysen der Tagesgänge des Wachstums an Einzelblättern mit Hilfe der DISP-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.3). Leider gab es bei den Auswertungen der Aufnahmen methodische Schwierigkeiten, so dass auf eine weitere Auswertung der Aufnahmen verzichtet wurde (siehe Kapitel 3.3.3). Aus diesem Grund soll hier nur sehr kurz auf die Ergebnisse eingegangen werden.

Die Analyse der Gesamtblattflächenentwicklung hatte gezeigt, dass es nur einen kleinen Effekt (unter Klimakammerbedingungen), bzw. keinen (unter Gewächshausbedingungen) in Hinblick auf die Wachstumsgeschwindigkeiten pro Tag der verschiedenen Tabaklinien gab (Vergleich absoluter Werte). Trotzdem könnten ja die Tagesgänge des Wachstums unterschiedlich sein, die Pflanzen also zu unterschiedlichen Zeiten Wachstumsmaxima-, oder minima zeigen. Deswegen wurde versucht, die Tagesgänge zu analysieren. Dabei wurden die relativen Wachstumsraten betrachtet, denn diese sind geeigneter, Wachstumsdynamiken von Pflanzen zu vergleichen (5%/h Wachstum sind hier letztlich aussagekräftiger als 5 cm²/h). Bei der RGR sind die Extrema des Wachstums sofort ersichtlich, bei der den absoluten Wachstumsgeschwindigkeiten müßte man noch die Ableitungen bilden. Neben den Stundenmittelwerten der RGR wurden ebenso die Tagesmittelwerte der RGR betrachtet, um verschiedene Tagesgänge der Pflanzen miteinander vergleichen zu können (siehe Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Gerade an den Übergängen der Lichtwechsel scheinen die größten Unterschiede zwischen den RNAi-PIP1-Pflanzen und den WT sichtbar zu sein. Verändert schien bei einem ersten Überblick über die Sequenzen vor allem die Höhe der Amplituden: die RNAi-PIP1-Pflanzen scheinen an den Lichtwechseln die größeren Maxima zu haben, aber z.T. zeigen sie auch die stärkeren Abfälle bis weit in den negativen Bereich hinein. Doch um diese Unterschiede quantitativ auswerten zu können, hätten die Daten an diesen Stellen verlässlich sein müssen. Doch dies war zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich (siehe Kapitel 3.3.3); gerade an diesen Stellen lieferte der Algorithmus keine Information. Am Übergang von der Dunkel-, zur Lichtphase öffnen die Stomata, Veränderungen in Bezug auf die Höhe der Amplituden in Bereich des Lichtwechsels würden dann auf eine gestörte Regulation der lichtinduzierten Öffnung der Stomata, bzw. einer gestörten Turgorregulation deuten, dies würde für eine Turgorsensing Funktion nach Hill et al. sprechen.

In einem weiteren Versuch (siehe Abb. 3.14) wurde dieses lichtinduzierte Öffnen und seine Auswirkung auf die RGR genauer untersucht. Deutlich sieht man dort ein stärkeres Oszillieren der RGR der RNAi-PIP1-Pflanzen, die wahrscheinlich darauf zurückgeht, dass die Pflanzen größere Schwierigkeiten haben ihre stomatären Öffnungsweiten einzustellen. Dies spricht ebenfalls für eine Funktion der PIP1 an einer Turgorregulation. Da sich in Bezug auf die Auswertung die gleichen Schwierigkeiten wie oben ergaben, wurden allerdings keine weiteren Versuche gemacht. Ein Oszillieren der stomatären Öffnungsweiten wurde ebenfalls bei NtAQP1 antisense-Tabakpflanzen beobachtet [Uehlein et al., 2003] und

bestätigen diese Ergebnisse ².

4.2 Keimung

Die Wachstumsanalysen (siehe Kapitel 3.3) zeigten, dass sowohl die transgenen Tabaklinien, als auch TEPIP1;2 zu späteren Zeitpunkten keimten als der Wildtyp, bzw. die Kontrollpflanzen. Der zeitliche Keimungsvorsprung der Tabak WT-Pflanzen und der *Arabidopsis*-Kontrollpflanzen hielt sich über den gesamten Entwicklungszeitraum der Blätter. Um dieses Ergebnis experimentell zu bestätigen, wurde die Keimungskinetik der verschiedenen Tabaklinien auf Filterpapier in Petrischalen bestimmt (siehe Kapitel 2.6). Die Keimungsexperimente, ergaben nun Unterschiede in der Testa-, und Endospermruptur der Samen (siehe Kapitel 3.5, Abb. 3.25). Bei den RNAi-PIP2-Samen riss die Testa am schnellsten auf, nach ca. 36 Stunden, dann folgten ungefähr 3.5 Stunden später die WT-Samen. Die RNAi-PIP1-Samen keimten am langsamsten, etwa 10 Stunden später als die RNAi-PIP2-Samen (siehe Tab. 3.8). Die maximalen Keimungsraten wichen ebenfalls deutlich voneinander ab: bei den RNAi-PIP1-, und WT-Samen waren sie ähnlich (ca. 92 %), während sie bei den RNAi-PIP2-Samen deutlich darunter lag (85%). Für die Endospermruptur ergibt sich ein ähnliches Bild: bei den RNAi-PIP2-Samen trat die Endospermruptur als erstes ein, nach 48.5 Stunden, nach weiteren 5 Stunden beim WT, und nach 11.4 Stunden bei den RNAi-PIP1-Samen (siehe Tab. 3.9). Der zeitliche Unterschied zwischen den Pflanzen blieb also ungefähr gleich groß. Dies bedeutet, dass ein Fehlen der PIP-Proteine die Kinetik der Testaruptur stark beeinflusst: fehlten die PIP2-Proteine, keimten die Samen unter diesen Bedingungen schneller als der Wildtyp, fehlten dagegen die PIP1-Proteine, fand die Testaruptur im Vergleich zum Wildtypen zeitlich verzögert statt. Ein Fehlen der PIP2-Proteine konnte zudem vom System schlechter ausgeglichen werden, wie man aus den niedrigeren maximalen Keimungsraten der RNAi-PIP2-Pflanzen schließen konnte. Ein Fehlen der PIP2-Proteine führte also schon bei der Keimung zu einer stärkeren Selektion. Wahrscheinlich beginnt dies schon bei der Blüten-, und Samenbildung. PIP2-Proteine spielen bei der Dehiscenz der Antheren eine Rolle [Bots et al., 2005b]. Es zeigte sich deutlich, dass PIPs einen starken Einfluss auf die Kinetik der Keimung ausüben. Vor allem die Testaruptur scheint beeinflusst zu sein; in der Endospermruptur wirkt noch die zeitliche Verschiebung aus der Testaruptur.

Ein Fehlen der PIP1-Proteine bewirkt eine zeitliche Verzögerung der Testaruptur. Dies steht in Einklang mit den Blattwachstumsanalysen, d.h. die beobachtete Verschiebung ist tatsächlich auf eine verzögerte Keimung der RNAi-PIP1-Pflanzen zurückzuführen. Das Keimungsexperiment ergab einen zeitlichen Unterschied zwischen WT-, und RNAi-PIP1-Samen von 6.5 Stunden, die Wachstumsanalysen ergeben ca. einen halben Tag Unterschied für die Gewächshausbedingungen und ca. 1-2 Tage für die Klimakammerbedingungen. Dass die Zahlen nicht genau übereinstimmen, ist bei den unterschiedlichen Bedingungen nicht weiter verwunderlich. Die Samen in den Petrischalen keimen schneller im Vergleich mit den Erdanzuchten. Dies kann u.a. mit den unterschiedlichen

²dort in Hinblick auf die Frequenzen der stomatären Leitfähigkeiten, in dieser Arbeit waren die Amplituden der RGR verändert

Lichtbedingungen zusammenhängen; bei dem Keimungsexperiment waren Dauerlichtbedingungen eingestellt. Durch den Lichtrhythmus bei den Gewächshaus-, und Klimakammerbedingungen können schon Unterschiede von 8 Stunden, bzw. 12 Stunden im Vergleich zu den Dauerlichtbedingungen zustande kommen, je nachdem wann die Samen im Laufe des Lichtrhythmus ausgesät wurden. Unter Dauerlichtbedingungen war gewährleistet, dass die Samen in jedem Fall zum rechten Zeitpunkt einen Lichtpuls erhielten, bei den Gewächshaus-, und Klimakammerbedingungen kann dieser Zeitpunkt in die Dunkelphase fallen, so dass erst beim Wiederanschalten des Lichtes, Stunden später, die Keimung erfolgen kann. Aus diesem Grund ergeben sich größere zeitliche Unterschiede zwischen den Klimakammer-, bzw. Gewächshausbedingungen und den Keimungsexperimenten unter Dauerlicht. Dies bedeutet, dass die ermittelten Werte aus den unterschiedlichen Experimenten recht gut zusammenpassen. Die zeitliche Verschiebung der Kurven der RNAi-PIP1-Pflanzen und des WT aus den Wachstumsanalysen lässt sich also aus einer späteren Testa-, und Endospermruptur der RNAi-PIP1-Pflanzen erklären. Bei den RNAi-PIP2-Samen beobachtet man dagegen ein konträres Keimungsverhalten zu den RNAi-PIP1-Samen: sie keimten auf dem Filterpapier gegenüber den WT-Samen schneller, sowohl bei der Testaruptur, als auch in Bezug auf die Endospermruptur, bei den Erdanzuchten dagegen langsamer als die WT-Samen. Warum dies so ist, kann hier nicht entschieden werden; auf einer Erdanzucht sind Samen variableren Umweltbedingungen ausgesetzt so z.B. Austrocknung. Die RNAi-PIP2-Samen reagieren sehr empfindlich auf wechselnde Umweltbedingungen wie bei verschiedenen Vorversuchen beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse zeigen ganz klar, dass PIP1-, und PIP2 sich sehr stark auf die Kinetik der Testaruptur, auswirken. Eine zeitliche Verzögerung des Aufreißen der Testa bei den RNAi-PIP1-Samen im Vergleich zu den WT-Samen lässt sich vielleicht damit erklären, dass sich in den Geweben unterhalb der Testa schlechter Druck aufbauen kann, um diesen mechanischen Widerstand zu durchbrechen. Dies würde für eine Funktion im Sinne einer Turgorregulation wie sie Hill et al. [Hill et al., 2004] vorschlagen sprechen (siehe oben). Während der ersten Phase der Wasseraufnahme entstehen Membrandefekte durch den rapiden Wassereinstrom in den Samen und infolge dessen verliert der Samen gelöste Stoffe an die Umgebung. In dieser Phase nimmt der Same auch seine respiratorische Aktivität wieder auf und die Proteinsynthese beginnt wieder [Bewley, 1997]. Gerade in Phase I und II bei einem schnellen Einstrom des Wassers ist eine Regulation des Turgors wichtig, damit nicht zuviel Wasser einfließt, aber doch genügend Wasser, um die mechanische Barriere der Samenschale zu überwinden. Eine Informationsweitergabe über den Turgorstatus innerhalb der Zellen spielt auch hier eine große Rolle. Bei den RNAi-PIP2-Samen verhält es sich genau umgekehrt: die Samen sind schneller als der WT. Dies könnte nach dem Modell von Hill et. al so interpretiert werden, dass ein Innendruck im Samen bei den RNAi-PIP2-Samen schneller aufgebaut wird, d.h. mehr Wasser in den Samen einströmt. Sind bei der Keimung also nur PIP1 vorhanden und fehlen PIP2, ist die Kinetik beschleunigt, und damit der Wassereinstrom; die PIP1 scheinen in dieser Situation zu einer besseren Leitfähigkeit von Wasser zu führen. Dies widerspricht jedoch vielen Untersuchungen, die im heterologen Oozytensystemen durchgeführt wurden. PIP1 die in Oozyten exprimiert werden, erhöhen nicht oder nur geringfügig die Wasserleitfähigkeit der Oozytenmembranen im

Gegensatz zu den PIP2 [Biela et al., 1999, Bots et al., 2005a, Daniels et al., 1994, Johansson et al., 1998, Moshelion et al., 2002, Suga and Maeshima, 2004].

Es ist schwierig die Ergebnisse der Keimung zu interpretieren, da hierfür auch wichtig wäre zu wissen in welcher Form die PIP-Proteine in der Plasmamembran vorliegen und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Aquaporine kommen als Tetramere in der Membran vor. AQP1 (Säugetiere), GlpF (Bakterien) und SoPIP2;1 (Spinat) liegen als Homotetramere vor [Murata et al., 2000, Fu et al., 2000, Fotiadis et al., 2001]. Daneben gibt es auch die Bildung von Heterotetrameren, so z.B. bilden zwei TIPs bei *Lens culinaris* Heterotetramere, aber auch Di- und Trimere [Harvengt et al., 2000]. Eine Multimerisation von Transportproteinen kann ihre Aktivität und Funktion regulieren [Veenhoff et al., 2002]. So gibt es Hinweise darauf, dass eine Co-Expression von *ZmPIP1;1*-, und *ZmPIP2* aus Mais in Oozyten in höheren Wasserleitfähigkeiten der Oozytenmembran resultieren [Fetter et al., 2004]. Dies ist abhängig von der Menge der PIP1 cRNA die den Oozyten injiziert wird. Weiterhin führt eine Interaktion zwischen *ZmPIP2* und *ZmPIP1;2* zu einer besseren Faltung und Stabilität der Proteine und damit zu einem effizienteren Einbau der Proteine in die Membran. Für *ZmPIP1;2* und verschiedene *ZmPIP2* konnten diese Effekte nicht beobachtet werden, jedoch führte eine Co-Expression von *ZmPIP1;2* und *ZmPIP1;1* ebenfalls zu einer Erhöhung der Wasserleitfähigkeit der Oozytenmembran. Transkripte von *ZmPIP1;2* und *ZmPIP1;1* sind in denselben Geweben des Mais nachgewiesen worden. Dies deutet auf eine positive Interaktion zwischen *ZmPIP1;2* und verschiedenen *ZmPIP2* hin. Die unterschiedlichen Kinetiken der verschiedenen RNAi-Linien gegenüber dem WT in dem vorliegenden Keimungsexperiment deuten vielleicht darauf hin, dass es solch eine gegenseitige Beeinflussung der PIP1-, und PIP2-Proteine auch bei der Keimung der Tabaksamen gibt. Wenn die PIP2-Proteine fehlen und nur noch die PIP1-Proteine vorhanden sind, beschleunigt sich die Kinetik, d.h. Wasser fließt in stärkerem Maße in den Samen ein und es baut sich ein stärkerer Innendruck auf. Dies bedeutet auch, dass PIP1-Proteine in diesem System (im Samen) eine gute Wasserleitfähigkeit besitzen. Vielleicht gibt es eine Art Rückkopplung zwischen PIP1-, und PIP2-Proteinen in der Weise, dass PIP2-Proteine das Schließen der PIP1 bewirken, d.h. dass die PIP1-Kanäle im Grundzustand offen sind und erst auf ein Signal hin schließen, vielleicht durch ein Signal der PIP2-Proteine. In der ersten Phase strömt aufgrund des stark negativen Wasserpotential des Samens hauptsächlich Wasser in den Samen ein, geht der Fluss also in eine Richtung. Wenn der Innendruck dann zu groß wird könnte eine Expression von PIP2 als Gegengewicht zu PIP1 eine Schließung der Kanäle bewirken. In den späteren Phasen wird auch eine Turgorregulation (zweite Phase, Wassereinstrom erreicht Plateau) wieder wichtig. Hier muss der Fluss von gelösten Stoffen und Wasser im Gleichgewicht sein. Bei der Keimung scheint eine Beeinflussung der PIP1-Proteine durch die PIP2-Proteine zu erfolgen und umgekehrt. Ein Ausschalten der PIP2 konnte außerdem vom Samen schlechter toleriert werden und hatte einen stärkeren negativen Effekt zur Folge; die maximale Keimungsrate dieser Samen war niedriger. Dies könnte daraufhin deuten, dass die PIP1 die PIP2 benötigen für ihre Funktionsfähigkeit und Aktivität, ähnlich wie bei *ZmPIP1;2* und verschiedenen *ZmPIP2* [Fetter et al., 2004].

4.3 Gaswechsel

Neben der Analyse des Blattwachstums bei *N.tabacum* wurden ebenfalls Photosynthesemessungen durchgeführt, da aus Experimenten bekannt ist, dass NtAQP1 CO_2 permeabel ist, und über eine Verfügbarkeit von CO_2 auch die Photosynthese und damit indirekt das Wachstum beeinflussen kann [Uehlein et al., 2003, Flexas et al., 2006]. Weiterhin ist von NtAQP1 bekannt, dass eine Reduktion der Expression des NtAQP1 sich auf die Öffnung der Stomata auswirkt [Uehlein et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit wurden A/C_i - und Lichtkurven analysiert und parallel dazu Fluoreszenzmessungen ausgewertet (siehe Kapitel 3.4.1 und 3.4.2). Dabei wurden zwei verschiedene Blattpositionen (7 und 9-10) untersucht. In Abhängigkeit von der Blattposition ergeben sich bei den A/C_i -Kurven deutliche Unterschiede zwischen den Pflanzen: bei der unteren Blattposition (7) sind die Nettphotosyntheseraten (A_N) der transgenen Pflanzen über den gesamten Messbereich deutlich höher als die der WT-Pflanzen (siehe Abb. 3.18). Bei den höheren Blattpositionen sieht man dies nicht mehr; die Kurven liegen näher beieinander. Einhergehend mit den niedrigeren Netto-Photosyntheseraten und C_i -Werten des WT wurden auch niedrigere Werte für die stomatären Leitfähigkeiten (g_s) gemessen (siehe Abb. 3.19). Dies ist auch wieder für die unteren Blattpositionen sehr deutlich ausgeprägt, bei den oberen Blattpositionen verliert sich dieser Effekt. Die Elektronentransportraten der verschiedenen Tabaklinien sind sehr ähnlich (siehe Abb. 3.20) und nicht signifikant unterschiedlich. Die NPQ-Werte zeigen, dass die transgenen Pflanzen bei den niedrigeren C_i -Konzentrationen gestresster sind, als die WT-Pflanzen (siehe Abb. 3.21); doch läßt sich bei diese. Diese Daten zeigen, dass die Photosyntheseraten von den stomatären Öffnungsweiten der Pflanzen bestimmt sind. Dies bedingt größeren Stress für die transgenen Pflanzen (höhere NPQ-Werte). Die Unterschiede in den stomatären Leitfähigkeiten sind in der unteren Blattposition, zumindest was die höheren C_i Konzentrationen betrifft, stärker ausgeprägt als in den oberen Blattstockwerken. Dies könnte mit einem unterschiedlichen Wasserstatus zusammenhängen.

Reaktion auf sich rasch ändernde CO_2 -Konzentrationen Die transgenen Pflanzen sind in der Lage Veränderungen der C_i -Konzentration wahrzunehmen und ihre Stomata entsprechend zu schließen oder zu öffnen, wie man aus den Verläufen der A/C_i -Kurven sehen kann. Verändert gegenüber den WT-Pflanzen ist allerdings die Öffnungsweite der Stomata; die RNAi-Pflanzen haben ihre Stomata weiter geöffnet. Es scheint so, als ob der Sollwert des Systems verändert ist, d.h. die transgenen Pflanzen können ihre Stomata während einer schnellen Veränderung der C_i -Konzentration weniger effektiv schließen. Die Lichtkurven dagegen zeigen ähnliche Nettphotosyntheseraten (siehe Abb 3.17).

Größere Varianz der Reaktion bei den transgenen Linien Bei den Blattpositionen 9-10 fällt bei den niedrigeren C_i -Konzentrationen auf, dass der Abstand zwischen den verschiedenen Linien sehr viel größer ist, als bei den höheren Konzentrationen. Die Reaktion der individuellen RNAi-PIP2-Pflanzen gegenüber diesen niedrigen C_i -Konzentrationen fällt extrem unterschiedlich aus, was man auch an den Fehlerbalken sehen kann (siehe Abb. 3.19, Abb. C.1, Abb.

C.2), diese sind sehr viel größer als die des WT oder der RNAi-PIP1-Pflanzen. Ähnliches zeigt sich auch in der Arbeit von M.Bots ([Bots et al., 2005b], fig.5). Das Stomata-regulierende System in das die Aquaporine involviert sind, ist durch eine Reduktion der PIP1-, und PIP2 sehr störungsanfällig. Geringe Änderungen der äußeren Bedingungen, oder des internen Status (variiere PIP-Mengen in den RNAi-Pflanzen, bzw. variiere PIP1/PIP2 Verhältnisse), provozieren sehr unterschiedliche Antworten vor allem bei den PIP2-Pflanzen (wie im Falle der Änderung des Verhältnisses der Antworten der PIP1-, und RNAi-PIP2-Pflanzen auf niedrige C_i -Konzentrationen). Die RNAi-PIP2-Pflanzen sind somit ein größeres Problem was die mathematische Auswertung angeht, auf der anderen Seite zeigt sich aber auch wieder, wie wichtig das Verhältnis der PIP1 und PIP2 zueinander ist (siehe auch Kapitel 2.6).

Reaktion der Stomata auf rasche Lichtwechsel Unterschiede zwischen den RNAi-PIP1-Pflanzen und den WT-Pflanzen ergaben sich ebenfalls beim lichtinduzierten Öffnen und anschließendem Schließen der Stomata im Dunklen, wie man aus Abb. 3.14 entnehmen kann. Hier ist die Amplitude der Reaktion der RNAi-PIP1-Pflanzen verändert, sie ist wesentlich höher als bei den WT-Pflanzen.

Die Regulation der Stomata ist dasjenige System im Rahmen dieser Arbeit, welches auf eine Reduktion von NtAQP1, bzw. NtAQP2 am stärksten reagiert. Ganz offensichtlich sind die transgenen Tabakpflanzen bei wechselnden CO_2 -Konzentrationen schlechter in der Lage ihre Stomata zu schließen, die Stomata bleiben im Vergleich zu denen der WT-Pflanzen weiter geöffnet, wobei die transgenen Pflanzen höhere NPQ-Werte zeigen, also einem größeren Stress ausgesetzt sind. Die weniger effektive Regulation der Stomata bedingt bei den transgenen Pflanzen unterschiedliche A/C_i -Kurven bei ähnlichen Assimilationskurven im Vergleich mit den WT-Pflanzen.

Aquaporine, sowohl TIPs als auch PIPs, wurden in vielen Fällen in den Schließzellen von Pflanzen nachgewiesen, so SunTIP7 und SunTIP20 [Sarda et al., 1997], SoPIP1;1 [Frayse et al., 2005], AtPIP1b [Kaldenhoff et al., 1995], NtAQP1 [Otto and Kaldenhoff, 2000] oder auch Aquaporine aus dem Plasmalemma von *Vicia* [Huang et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit sind bei den RNAi-Pflanzen die stomatären Leitfähigkeiten gegenüber den Wildtypen größer. Zu beurteilen an welchen Stellen diese Proteine in die Regulation der Stomatabewegung eingreifen ist schwierig. Die Reaktionen der Pflanzen fallen sehr unterschiedlich aus, sowohl zwischen den Blattpositionen dieser Versuche als auch im Vergleich zu den antisense NtAQP1-PTabakpflanzen [Uehlein et al., 2003, Flexas et al., 2006]. Unterschiede zu diesen antisense NtAQP1 Pflanzen ergeben sich wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Methoden der Reduzierung der Expression der PIP (RNAi versus antisense Technik).

Da die RNAi-PIP1-Pflanzen während des Lichtwechselversuchs mit einer ähnlichen Geschwindigkeit reagieren wie die Wildtyppflanzen, kann man auch hier eine Beeinträchtigung der Prozesse durch verminderte Wasserpermeabilitäten wahrscheinlich ausschließen. Eine wichtige Funktion könnten auch hier die PIP-Proteine als Turgorsensor nach Hill et al. besitzen. Wie es auch im Tonoplasten der Vakuole wahrscheinlich TIPs gibt, die Sensoren für osmotische

Druckgradienten sind und den Efflux von Ionen beeinflussen können, ist auch eine Informationsweitergabe vom Plasmalemma an den Tonoplasten wichtig, da die Ionenflüsse ja über beide Membranen reguliert werden müssen [MacRobbie, Enid A. C., 2006]. Das Schließen der Stomata erfordert einen Netto-Efflux von K^+ -Ionen über den Tonoplasten und das Plasmalemma der Schließzellen. Dies resultiert in einem Turgor-, und Volumenverlust der Schließzellen und hat das Schließen der Stomata zur Folge. Die Kontrolle dieses Ionen-Efflux aus der Vakuole ist bis jetzt noch nicht gut verstanden [MacRobbie, Enid A. C., 2006]. An welcher Stelle dieser Mechanismen jetzt die PIP1- und PIP2-Proteine eingreifen lässt sich hier nicht klären, nur, dass sie es tun. Bei den A/C_i -Kurven zeigt sich, dass die transgenen Pflanzen durchweg höhere stomatäre Leitfähigkeiten besitzen, es scheint so, dass die transgenen Tabakpflanzen hier Schwierigkeiten haben, den Turgor der Schließzellen zu erniedrigen, so dass die Stomata schließen. Der Turgor in den Schließzellen der transgenen Pflanzen scheint zu hoch eingestellt, vielleicht ist ein Teil der Rückkopplung gestört, der den Anionen-Efflux aus der Vakuole bewirkt. Da die Stomata prinzipiell ja noch schließen, funktioniert der Schließmechanismus zum Teil noch. Eine Hypothese geht dahin, dass ein Aquaporin des Plasmalemmas ein Signal des Turgorstatus an einen Ca^{2+} -Kanal des Tonoplasten übermittelt [MacRobbie, Enid A. C., 2006]; bei einem bei Ausfall dieses Aquaporins wäre dann das Signal für einen Ca^{2+} -Kanal der Vakuole unterbrochen und damit der Efflux von Ca^{2+} . Die hohe Sensitivität der transgenen Linien, die sich auch in höheren Fehlern widerspiegelt, spricht für eine Funktion dieser Proteine bei einer Detektion von Drücken und einer Regulation des Turgors. Einen Ausfall dieser Proteine scheinen die Pflanzen in Hinblick auf die Stomataregulierung schlechter ausgleichen zu können, als das beim Expansionswachstum der Blätter der Fall ist.

Neben diesen Funktionen gibt es Hinweise darauf, dass das Aquaporin NtAQP1 CO_2 leiten kann [Uehlein et al., 2003] und hierüber die Leitfähigkeit des Mesophylls beeinflusst [Flexas et al., 2006]. Antisense NtAQP1-Tabakpflanzen weisen Kontrollpflanzen gegenüber geringere g_m -Werte (g_m ist die Mesophyll-Leitfähigkeit) auf und entsprechend weisen NtAQP1 überexprimierende Pflanzen höhere g_m -Werte auf. Ob bei den RNAi-Pflanzen ebenfalls eine veränderte Mesophyll-Leitfähigkeit vorlag, konnte mit diesen Versuchen nicht entschieden werden, da g_m nicht bestimmt wurde. Ausgeschlossen werden kann eine Beeinflussung des g_m durch eine verminderte Expression der PIP hier nicht, jedoch auch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die erhöhten Nettophotosyntheseraten der transgenen Pflanzen in dieser Arbeit sind auf erhöhte stomatäre Leitfähigkeiten zurückzuführen. Unterschiede zwischen den antisense- und RNAi-Pflanzen werden auf unterschiedlichen Techniken der Reduktion der Expression der PIP zurückgeführt; insofern sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht im Widerspruch zu den oben genannten zu sehen.

4.4 Fehlerabschätzung des Screeningverfahrens

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war es, die mit dieser Messmethode gemachten Fehler abschätzen zu können. Deswegen wurden Daten des Growscreens, mit denen einer Linealmessung verglichen. Neben der Frage einer Fehlerabschätzung, ist es ebenfalls wichtig zu wissen, in welcher Beziehung die Blattfläche, die über

den Growscreen ermittelt wird, zu derjenigen der Linealmessung steht und ob die Blattbewegung systematisch im Tagesverlauf erfolgt.

Fehlerabschätzung der Zuwachsraten Die Gesamtblattfläche, die über den Growscreen ermittelt wird, ist die Projektion einer Blattfläche. Sie wird beeinflusst von der Überlappung und der Bewegung der Blätter im Tagesverlauf. Dies lässt sich deutlich aus Tab. 3.1 und Abb. 3.2 ablesen. Es ergibt sich aus dem Vergleich der verschiedenen Messmethoden für die verschiedenen Tabaklinien ein relativer Fehler der Zuwachsraten von ca. 10% in diesem Zeitraum (für diesen speziellen Entwicklungsstand und den Zeitraum zwischen 11 und 15 Uhr). An dieser Beobachtung sieht man nochmals deutlich, dass die Wachstumsraten, die mit dem Growscreen ermittelt werden, als Steigung aus Abb. 3.2, eine Funktion der Blattbewegung und des Zuwachses sind. Falls man keine vergleichenden Handmessungen gemacht hat, lässt sich aus diesen Daten nicht abschätzen, welcher Anteil wirklicher Zuwachs ist, und welcher Anteil durch die Blattbewegung verursacht wird („virtuelles“ Wachstum). Die relative Wachstumsrate nach Formel 2.2 wurde daher nicht berechnet, da nicht für den gesamten Entwicklungszeitraum solche Handmessungen gemacht worden waren. Die RGR ist zudem eine abgeleitete Größe aus der Gesamtblattfläche, so dass mit einer Summierung der Fehler (Gaußsche Fehlerfortpflanzung) gerechnet werden muss. Eine Abschätzung der Wachstumsgeschwindigkeiten war aus dem Parameter b der Fitfunktionen der Kurven der Gesamtblattflächenentwicklung möglich (siehe Kapitel 3.3).

Vergleich der Gesamtblattflächen und Bewegung im Tagesverlauf Aus Abb. 3.3 ergibt sich für alle Pflanzen und Zeitpunkte eine lineare Beziehung der Gesamtblattflächenwerte für die verschiedenen Tabaklinien. Dies bedeutet, dass die Werte der Blattflächen einander proportional, und somit bis auf einen Faktor, gleich sind. Eine Umrechnung der projizierten Blattflächenwerte in die tatsächlichen Gesamtblattflächen über Korrekturkurven ist wahrscheinlich möglich, doch in der Praxis aufwendig. Da nur zu einem Zeitpunkt begleitende Linealmessungen gemacht wurden, ist nicht klar, inwieweit sich dieser Faktor im Laufe der Entwicklung ändert.

Die Blattbewegung der verschiedenen Tabaklinien erfolgt im Tagesverlauf systematisch, wie aus Abb. 3.4 ersichtlich ist. Sicherlich gilt dies auch für die *A. thaliana* T-DNA Insertionsmutanten, doch konnten hier keine parallelen Linealmessungen oder ähnliches gemacht werden. Wenn man die Blattflächen stets zu den gleichen Zeiten misst, und damit ein gleich großes Messintervall gewährleistet, lassen sich auch Pflanzen mit unterschiedlichen Tagesgängen in der Blattbewegung miteinander vergleichen, wenn diese Blattbewegung systematisch erfolgt, was in diesen Fällen zutraf. Es zeigte sich, dass die mit dem Growscreen ermittelten projizierten Blattflächen proportional zu den absoluten Blattflächen sind. Weiterhin ergibt sich, dass die Wachstumsraten, die durch den Growscreen ermittelt werden, keine Wachstumsraten im Sinne von Gl. 2.2 sind, sondern eine Funktion der Blattbewegung und des Zuwachses sind, aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet die RGR aus den Flächendaten zu berechnen. Ein wesentlicher Vorteil des Screeningsystems ist es, eine große Anzahl von Pflanzen messen und analysieren zu können und damit statistisch gesichere

Ergebnisse erhalten zu können. Eine hohe Stichprobenanzahl ermöglicht eine gute Kurvenanpassung des vorderen Bereichs einer sigmoiden Wachstumskurve, aus der sich dann die Wachstumsgeschwindigkeiten abschätzen lassen. Um Fehler bei der Blattflächenbestimmung zu verringern und Messpunkte verschiedener Tage vergleichen zu können, sollte zur gleichen Uhrzeit gemessen werden, was in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurde.

4.5 Zusammenfassung

Ziel der Doktorarbeit war es den Einfluss von PIP1 und PIP2 auf das Expansionswachstum der Blätter zu untersuchen; zwei Modellpflanzen wurden näher analysiert: zum einen RNAi-Pflanzen von *N.tabacum*, bei welchen die Expression der PIP1 oder der PIP2-Proteine unterdrückt war, zum anderen zwei T-DNA Insertionsmutanten von *A.thaliana*, wobei die Intronmutante eine zum WT unveränderte Expression des AtPIP1;2 zeigte und deswegen als Kontrolle benutzt wurde.

Die zeitliche Entwicklung des Gesamtblattwachstums wurde dabei mit Hilfe eines automatischen Screeningsystems (Growscreen) ermittelt. Die Analyse der Gesamtblattflächenentwicklung hat sowohl bei den RNAi-Tabakpflanzen als auch den *Arabidopsis* TEPIP1;2 Pflanzen gezeigt, dass der Haupteffekt beim Wachstum eine um einen halben bis einen Tag verzögerte Keimung der genetisch veränderten Pflanzen gegenüber den Kontrollen war. Der Wachstumsvorsprung der Kontrollen hielt sich bis zum Ende der Gesamtblattflächenentwicklung. Die Wachstumsdynamik der Pflanzen, deren Wachstumsgeschwindigkeiten, unterschieden sich nur minimal voneinander; die Endblattflächen der *Arabidopsis* T-DNA-Insertionsmutanten unterschieden sich nicht voneinander, die des Tabaks nur um 4%. Dies bedeutet das die genetisch veränderten Pflanzen unter optimalen Wachstumsbedingungen ein ähnliches Wachstum zeigen, d.h. unter diesen Bedingungen scheinen PIP1 und PIP2 keinen großen Einfluss auf das Expansionswachstum der Blätter auszuüben. Ein Einfluss der PIP1 und PIP2 über eine bloße Erhöhung der Wasserleitfähigkeiten erscheint deswegen unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit gab es eher Hinweise dafür, dass PIP1 und PIP2 eine wesentliche Funktion bei der Turgordetektion und -regulation (siehe [Hill et al., 2004]) ausüben. Eine verminderte Expression der PIPs beim Tabak bewirken eine veränderte Keimungskinetik, dies zeigte ein Keimungsexperiment auf Filterpapier; vor allem die Kinetik der Testaruptur war verändert, ob dies auch für die Endospermruptur gilt konnte nicht ausgeschlossen werden. Bei den RNAi-PIP1-Samen erfolgte die Keimung auf Filterpapier langsamer, wie auch bei der Erdanzucht; bei den RNAi-PIP2-Samen erfolgte sie dagegen schneller, im Gegensatz zu den Erdanzuchten. Auch hier scheint die Turgorregulation gestört zu sein, fällt diese aus, verändert sich die Keimungskinetik. Die größten Effekte einer reduzierten Expression der PIP1 und PIP2 und eine der deutlichsten Hinweise auf eine Funktion der PIP1 und PIP2 als Turgorsensoren, zeigten sich bei Gaswechseluntersuchungen der Tabakpflanzen; die transgenen Pflanzen konnten ihre Stomata weniger effektiv regulieren, bzw. weniger effektiv Schließen. Dies bedingte unterschiedliche A/C_i -Kurven bei ähnlichen Assimilationskurven. Einzelmessungen von Tabakpflanzen mit der DISP-Methode stützten diese Hypothese ebenfalls; es ergaben sich stärkere Oszillationen der Stomatabewegungen der transgenen Pflanzen bei raschen Lichtwechseln. Unterschiede der transgenen Pflanzen zum Wildtypen traten erst unter dynamischen, sich rasch ändernden Umweltbedingungen deutlich zu Tage.

Literaturverzeichnis

- Bertalanffy, L. (1960). *Fundamental aspects of normal and malignant growth*, chapter Principles and theory of growth, pages 137–259. Amsterdam-London-New York-Princeton:Elsevier.
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9:1055–1066.
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R., and Kaldenhoff, R. (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.*, 18:565–570.
- Bigün, J. and Granlund, G. (1987). Optical orientation detection of linear symmetry. In *Proceedings of the First International Conference on Computer Vision, ICCV, London, England*.
- Bilger, W. and Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25:173–185.
- Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., and Mariani, T. (2005a). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, 56(409):113–121.
- Bots, M., Vergeldt, F., Wolters-Arts, M., Weterings, K., and van As, H. (2005b). Aquaporins of the PIP2 Class Are Required for Efficient Anther Dehiscent in Tobacco. *Plant Physiology*, 137(3):1049–1056.
- Brown, R. and Mayer, D. (1988). Representing cumulative germination. 2. The use of the Weibull function and other empirically derived curves. *Annals of Botany*, 61:127–138.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., and Chrispeels, M. J. (2000). Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity. *Plant Physiology*, 122(4):1025–1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M., and Jung, R. (2001). Aquaporins constitute a large and high divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, 125:1206–1215.

- Christ, M. (2005). *Temporal and Spatial Patterns of Growth and Photosynthesis in Leaves of Dicotyledonous Plants Under Long-Term CO₂- and O₃-Exposure*. PhD thesis, Universität Düsseldorf.
- Cosgrove, D. (1986). Biophysical control of plant cell growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1):377–405.
- Cosgrove, D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1):391–417.
- Cumming, G., Fidler, F., and Vaux, D. L. (2007). Error bars in experimental biology. *The Journal of Cell Biology*, 177:7–11.
- Cumming, G. and Finch, S. (2005). Inference by eye: Confidence intervals and how to read pictures of data. *American Psychologist*, 60:170–180.
- Daniels, M., Chaumont, F., Mirkov, T., and Chrispeels, M. (1996). Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell*, 8:587–599.
- Daniels, M., Mirkov, T., and Chrispeels, M. (1994). The plasma membrane aquaporin of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiology*, 106:1325–1333.
- Dordas, C., Chrispeels, M., and Brown, P. (2000). Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiology*, 124:1349–1362.
- Edwards, K., Johnston, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR-analysis. *Nucleic Acids Research*, 19:1349.
- Eisenbarth, D. A. and Weig, A. R. (2005). Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 56(417):1831–1842.
- Erickson, R. (1976). Modeling of Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 27:407–434.
- Farquhar, G., von Caemmerer, S., and Berry, J. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149:78–90.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., and Chaumont, F. (2004). Interactions between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. *The Plant Cell*, 16:215–228.
- Finch-Savage, W. E. and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist (Tansley Review)*, 171:501–523.
- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J., and Martinoia, E. (1997). Increased expression of vacuolar aquaporin and H⁺-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiology*, 114:827–834.

- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Hanson, D., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H., and Kaldenhoff, R. (2006). Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO_2 *in vivo*. *The Plant Journal*, 48:427–439.
- Fotiadis, D., Jenó, P., Mini, T., Wirtz, S., Müller, S. A., Frayssé, L., Kjellbom, P., and Engel, A. (2001). Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3):1707–1714.
- Frayssé, L. C., Wells, B., McCann, Maureen, C., and Kjellbom, P. (2005). Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells. *Biology of the Cell*, 97(7):519–534.
- Fritsch, C. (2005). Proteinverteilung des Aquaporins NtAQP1 im Tabak während der Entwicklung und bei Stressreaktionen. Master's thesis, Technische Universität Darmstadt.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J. W., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R. M. (2000). Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. *Science*, 290(5491):481–486.
- Gao, Y.-P., Young, L., Bonham-Smith, P., and Gusta, L. V. (1999). Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Molecular Biology*, 40:635–644.
- Genty, B., Briantais, J., and Baker, N. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990:87–92.
- Hanzwa, Y., Takahashi, T., and Komeda, Y. (1997). ACL5: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *The Plant Journal*, 12(12):863–874.
- Harvengt, P., Vlerick, A., Fuks, B., Wattiez, R., Ruyschaert, J. M., and Hombale, F. (2000). Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg^{2+} -dependent and Ca^{2+} -regulated kinase. *Biochemical Journal*, 352(1):183–190.
- Hill, A., Sachar-Hill, B., and Sachar-Hill, Y. (2004). What Are Aquaporins For? *Journal of Membrane Biology*, 197:1–32.
- Höfte, H., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Herman, E. M., and Chrispeels, M. J. (1992). Vegetative and Seed-Specific Forms of Tonoplast Intrinsic Protein in the Vacuolar Membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 99:561–570.
- Huang, R.-F., Zhu, M.-J., Kang, Y., Chen, J., and Wang, X.-C. (2002). Identification of Plasma Membrane Aquaporin in Guard Cells of *Vicia faba* and Its Role in Stomatal Movement. *Acta Botanica Sinica*, 44(1):42–48.
- Jahn, T., Møller, A., Zeuthen, T., Holm, L., Klaerke, D., Mohsin, B., Kühlbrandt, W., and Schjoerring, J. (2004). Aquaporins in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters*, 574:31–36.

- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayse, L., Weig, A., and Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 126:1358–1369.
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C., and Kjellbom, P. (1998). Water Transport Activity of the Plasma Membrane Aquaporin PM28A Is Regulated by Phosphorylation. *Plant Cell*, 10(3):451–460.
- Johnson, K., Herman, E., and Chrispeels, M. (1989). An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiology*, 91:1006–1013.
- Jung, J., Preston, G., Smith, B., Guggino, W., and Agre, P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. *J. Biol. Chem.*, 269:14648–14654.
- Kaldenhoff, R., Grote, K., Zhu, J.-J., and Zimmermann, U. (1998). Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 14(1):121–128.
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, A., Karman, U., Ruppel, G., and Richter, G. (1995). The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein. *Plant Journal*, 7:87–95.
- Lockhart, J. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology*, 8:264–275.
- Long, S. P. and Bernacchi, C. J. (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*, 54(392):2393–2401.
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E., and Chrispeels, M. (1992). The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiology*, 100:1633–1639.
- MacRobbie, Enid A. C. (2006). From the Cover: Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells. *PNAS*, 103(4):1135–1140.
- Maeshima, M., Hara-Shimamura, I., Takeuchi, Y., and Nishimura, M. (1994). Accumulation of vacuolar H^+ -pyrophosphatase and H^+ -ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. *Plant Physiology*, 106:61–69.
- Manter, D. and Kerrigan, J. (2004). A/C_i curve analysis across a range of woody plant species: influence of regression analysis parameters and mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany*, 55(408):2581–2588.
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G. B., Nobel, P., and Chrispeels, M. (2002). Plasma Membrane Aquaporins Play a Significant Role during Recovery from Water Deficit. *Plant Physiology*, 130(4):2101–2110.

- Maurel, C., Chrispeels, M., Lurin, C., Tacnet, F., Geelen, D., Ripoche, P., and Guern, J. (1997). Function and regulation of seed aquaporins. *Journal of Experimental Botany*, 48:421–430.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J., and Chrispeels, M. (1993). The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 12:2241–2247.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N. (2006). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659–668.
- McQueen-Mason, S. (2005). Cell walls: the boundaries of plant development. *New Phytologist*, 166:717–722.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N., and Kaldenhoff, R. (2002). Plasma Membrane Aquaporins in the Motor Cells of *Samanea saman*: Diurnal and Circadian Regulation. *Plant Cell*, 14(3):727–739.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473–497.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804):599–605.
- Niemitz, C. and Tyerman, S. (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Letters*, 465:110–114.
- Otto, B. and Kaldenhoff, R. (2000). Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 211(2):167–172.
- Peek, M. S., Russek-Cohen, E., Wait, A. D., and Forseth, I. N. (2002). Physiological response curve analysis using nonlinear mixed models. *Oecologia*, 132:175–180.
- Potvin, C., Lechowicz, M., and Tardif, S. (1990). The statistical analysis of eco-physiological response curves obtained from experiments involving repeated measurements. *Ecology*, 71:1389–1400.
- Preston, G., Carroll, T., Guggino, W., and Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256:385–387.
- Quinn, G. P. and Keough, M. J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press.
- Rayle, D. L. and Cleland, R. E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4):1271–1274.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J., Casse-Delbart, F., and Lamaze, T. (1997). Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *The Plant Journal*, 12(5):1103–1111.

- Scharr, H. (2005). Optimal filters for extended optical flow. In *International Workshop on Complex Motion, LNCS 3417*.
- Schmundt, D., Stitt, M., Jaehne, B., and Schurr, U. (1998). Quantitative analysis of local growth rates of dicot leaves at high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant Journal*, 16:505–514.
- Schuurmans, J. A., van Dongen, J. T., Rutjens, B. P., Boonman, A., Pieterse, C. M., and Borstlap, A. C. (2003). Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Molecular Biology*, 53(655-667).
- Siefritz, F., Biela, A., Eckert, M., Otto, B., Uehlein, N., and Kaldenhoff, R. (2001). The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *Journal of Experimental Botany*, 52(363):1953–1957.
- Siefritz, F., Otto, B., Bienert, G. P., van der Krol, A., and Kaldenhoff, R. (2004). The plasma membrane aquaporin NtAQP1 is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *Plant Journal*, 37(2):147–155.
- Siefritz, F., Tyree, M. T., Lovisolo, C., Schubert, A., and Kaldenhoff, R. (2002). PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in Tobacco: From Cellular Effects to Function in Plants. *Plant Cell*, 14:869–876.
- Siegfarth, S. (2007). Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten des Aquaporins PIP1;2 aus *Arabidopsis thaliana*. Master’s thesis, Technische Universität Darmstadt.
- Suga, S., Imawaga, S., and Maeshima, M. (2001). Specificity of the accumulation of mRNAs and proteins of the plasma membrane and tonoplast aquaporins in radish organs. *Planta*, 212:294–304.
- Suga, S. and Maeshima, M. (2004). Water Channel Activity of Radish Plasma Membrane Aquaporins Heterologously Expressed in Yeast and Their Modification by Site-Directed Mutagenesis. *Plant Cell Physiology*, 45(7):823–830.
- Tomos, D. and Pritchard, J. (1994). Biophysical and biochemical control of cell expansion in roots and leaves. *Journal of Experimental Botany*, 45:1721–1731.
- Trewavas, A. J. and Malho, R. (1997). Signal Perception and Transduction: The Origin of the Phenotype. *Plant Cell*, 9(7):1181–1195.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., and Kaldenhoff, R. (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 425:734–737.
- Veenhoff, L. M., Heuberger, E. H., and Poolman, B. (2002). Quaternary structure and function of transport proteins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(5):242–249.
- Virk, S. and Cleland, R. (1988). Calcium and the mechanical properties of soybean cell walls: possible role of calcium and protons in cell-wall loosening. *Planta*, 176:60–67.

- Virnich, O. (2006). Regulation von Blattwachstumsdynamik in *Arabidopsis thaliana*. Master's thesis, Universität Düsseldorf.
- von Caemmerer, S. (2000). *Biochemical models of leaf photosynthesis*. Canberra, Australia:CSIRO Publishing.
- Walter, A. (1997). Quantitative Analyse des Wachstums von *Nicotiana tabacum* unter besonderer Berücksichtigung des Sink-Source-Verhaltens. Master's thesis, Universität Heidelberg.
- Walter, A., Feil, R., and Schurr, U. (2000). Restriction of nyctinastic movements and application of tensile forces to leaves affects diurnal patterns of growth. *Functional Plant Biology*, 29:1247–1258.
- Walter, A., Scharr, H., Gilmer, F., Zierer, R., Nagel, K. A., Ernst, M., Wiese, A., Virnich, O., Christ, M. M., Uhlig, B., Junger, S., and Schurr, U. (2007). Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: a setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytologist*, 174:447–455.
- Walter, A. and Schurr, U. (1999). The modular character of growth in *Nicotiana tabacum* plants under steady-state nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 50:1169–1177.
- Weig, A., Deswarte, C., and Chrispeels, M. J. (1997). The Major Intrinsic Protein Family of Arabidopsis Has 23 Members That Form Three Distinct Groups with Functional Aquaporins in Each Group. *Plant Physiology*, 114(4):1347–1357.
- Willigen, C., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y., and Maurel, C. (2006). Expression and Inhibition of Aquaporins in Germination *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell Physiology*, 47(9):1241–1250.
- Yu, J., Yool, Andrea, J., Schulten, K., and Tajkhorshid, E. (2006). Mechanism of Gating and Ion Conductivity of a Possible Tetrameric Pore in Aquaporin-1. *Structure*, 14:1411–1423.

Tabellenverzeichnis

2.1	Programm der Standard-PCR	15
2.2	Verwendete Oligonukleotide für die PCR	15
2.3	Fluoreszenzparameter nach [Maxwell and Johnson, 2006]	24
3.1	Fehlerabschätzung Growscreen: Wachstumsraten Screening- vs. Linealmessung	29
3.2	<i>A.thaliana</i> : Änderung der Wachstumsraten im Tagesverlauf . . .	31
3.3	Parameter der Kurvenanpassung für die Blattflächenentwicklung von <i>N.tabacum</i> im Gewächshaus	37
3.4	Parameter der Kurvenanpassung der Blattflächenentwicklung von <i>N.tabacum</i> in der Klimakammer	43
3.5	Parameter der Kurvenanpassung der Blattflächenentwicklung von <i>A.thaliana</i>	50
3.6	Gaswechsel <i>N.tabacum</i> : Parameter der Kurvenanpassung der As- similationskurven	53
3.7	Parameter der Kurvenanpassung der A/C_i -Kurven von <i>N.tabacum</i>	55
3.8	Kinetik der Testaruptur bei den verschiedenen Tabaklinien . . .	60
3.9	Kinetik der Endospermruptur bei den verschiedenen Tabaklinien	61

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufriss eines Aquaporins mit den entsprechenden Drücken beim Osmosensor Modell	4
1.2	Aufriss eines Aquaporins mit den entsprechenden Drücken beim Turgorsensor Modell	5
2.1	<i>N.tabacum</i> : Anzucht in der Klimakammer	13
2.2	<i>A.thaliana</i> : TIPI1;2 und TEPI1;2 im Vergleich	13
2.3	Screeningbilder von <i>A.thaliana</i> : Original- und farbcodiertes Bild .	18
2.4	Screening-Aufbau	22
2.5	DISP-Aufbau	22
2.6	<i>N.tabacum</i> : Aufbau der Gaswechsel- und Fluoreszenzmessung . .	23
3.1	PCR-Analyse	28
3.2	Fehlerabschätzung Growscreen:Vergleich Growscreen vs. Lineal- messung	30
3.3	Beziehung der $BF_{ges.}$: Growscreen und Linealmessung	33
3.4	<i>N.tabacum</i> : Änderung der Wachstumsraten im Tagesverlauf . . .	34
3.5	<i>A.thaliana</i> : Änderung der Wachstumsraten im Tagesverlauf . . .	35
3.6	Blattflächenentwicklung von <i>N.tabacum</i> im Gewächshaus	37
3.7	Wachstumsdynamik von <i>N.tabacum</i> im Gewächshaus: angepasste Kurven	38
3.8	95 % Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter a , b und t_0 aus der Kurvenanpassung des Gewächshausversuchs	39
3.9	Unterschiede der Blattflächen von <i>N.tabacum</i> in Abhängigkeit von den Blattpositionen	41
3.10	Blattflächenentwicklung von <i>N.tabacum</i> in der Klimakammer: an- gepasste Kurven	42
3.11	95 % Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter b und t_0 aus der Kurvenanpassung des Klimakammerversuchs	43
3.12	Tagesgang der relativen Wachstumsrate (RGR) von <i>N.tabacum</i> : Sequenz vom 15.08.05-17.08.05	46
3.13	Tagesgang der relativen Wachstumsrate (RGR) von <i>N.tabacum</i> : Sequenz vom 5.09.05 - 7.09.05	47
3.14	Reaktion der RGR auf schnelle Licht-/Dunkelwechsel bei <i>N.tabacum</i>	48
3.15	Blattflächenentwicklung von <i>A.thaliana</i>	50
3.16	<i>A.thaliana</i> : Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter a , b und t_0 aus der Kurvenanpassung	51
3.17	Gaswechsel <i>N.tabacum</i> : Parameter der Kurvenanpassung der As- similationskurven	52

3.18	A/C_i -Kurven der verschiedenen Tabaklinien (PIP1, PIP2, WT) .	56
3.19	Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeiten (g_s) von den Netto-Photosyntheseraten (A_N) bei <i>N.tabacum</i>	56
3.20	Elektronentransportraten der verschiedenen Tabaklinien	57
3.21	NPQ-Werte der verschiedenen Tabaklinien	58
3.22	Testaruptur von <i>N.tabacum</i> : RNAi-PIP1-Same	60
3.23	Testaruptur: Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter t_0 und a aus der Kurvenanpassung	60
3.24	Endospermruptur: Konfidenzintervalle (CIs) der Parameter t_0 und a aus der Kurvenanpassung	61
3.25	Keimungskinetik von <i>N.tabacum</i>	62
C.1	A/C_i -Kurven der verschiedenen Tabaklinien: RNAi-PIP2 vs. WT	96
C.2	A/C_i -Kurven der verschiedenen Tabaklinien (PIP1, PIP2, WT) .	97

Anhang A

Parameterdatei - Screening

Parameter für die Farbsegmentierung: Beispieldatei für *A.thaliana*

params.txt

H1-high 75

H1-low 45

S1-high 254

S1-low 95

V1-high 150

V1-low 30

verbose 1

nmax 54

OUTPUT-CHANNELS 0

OUTPUT-MASKED-CHANNELS 0

OUTPUT-MASK 0

OUTPUT-MASKED-COLOR 1

OUTPUT-COLOR 0

OUTPUT-AREA 1

STDOUT-AREA 1

BayerFormat 1

ConversionMethod 4

SmoothMode 2

SmoothSizeX 1

SmoothSizeY 1
HitAnyKeyAtEnd 0
OpenIter 0
CloseIter 0
MINSIZE-OBJECTS 50
MINSIZE-HOLES 40
AOI-ULX 600
AOI-ULY 330
AOI-LRX 1000
AOI-LRY 720

Die Parameter H (Hue/Farbton), S (Saturation/Sättigung) und V (Value) können Werte zwischen 0 und 255 einnehmen. Mit high und low werden die oberen und unteren Grenzen der Schwellenwerte festgelegt. nmax gibt die maximale Anzahl an Bildern an, die ausgewertet werden soll, output gibt an, welche Dateien ausgegeben werden sollen, dabei bedeutet 0 = nicht ausgeben und 1 = ausgeben. In diesem Fall wird die Textdatei mit der Gesamtzahl pixel ausgegeben (OUTPUT-AREA=1) und das farbsegmentierte Bild (OUTPUT-MASKED-COLOR=1). Es ist ebenso möglich, sich die einzelnen Kanäle (für den Farbton, die Sättigung und die Grauwerte) ausgeben zu lassen (mit OUTPUT-CHANNELS). Mit MINSIZE-OBJECTS, können kleine Objekte, die mitsegmentiert wurden, z.B. kleine Moos-, oder Algenflecken, ausgeschlossen werden (über die Größe; die Zahl gibt die Größe der auszuschließenden Objekte in Pixeln an). MINSIZE-HOLES füllt Löcher auf, die auf den Blättern nicht mitsegmentiert wurden, weil z.B. bestimmte Stellen auf dem Blatt das Licht stärker reflektieren. Die Zahl gibt hier ebenfalls die Größe in Pixeln an. Die AOI (Area of Interest) gibt den Bereich des Bildes an, der bearbeitet werden soll.

Anhang B

Filtereinstellungen für die DISP-Analyse

Parameter der DISP-Analyse; Beispieldatei für *N.tabacum*

[noise]: 0.00239
[tau]: 0.0008
[pyrstufe]: 1
[pyr-st]: 2
[pyr-out]: 2
[threshold]: 15
[hochpasssize]: 21
[b-rec-x]: 0.55 0.45
[b-rec-y]: 0.55 0.45
[viter]: 5
[viter-rec]: 10
[vsmooth]: 1000

Filtereinstellungen (für weitere Informationen siehe [Scharr, 2005])

[Dx]: 0.5 0 -0.5
[Dx_y]: 0.1875 0.625 0.1875
[Dx_t]: 0.1875 0.625 0.1875
[Dy]: 0.5 0 -0.5
[Dy_x]: 0.1875 0.625 0.1875
[Dy_t]: 0.1875 0.625 0.1875
[Dt]: 0.5 0 -0.5
[Dt_x]: 0.1875 0.625 0.1875
[Dt_y]: 0.1875 0.625 0.1875
[B_x]: 0.0625 0.25 0.375 0.25 0.0625
[B_y]: 0.0625 0.25 0.375 0.25 0.0625
[B_t]: 0.0625 0.25 0.375 0.25 0.0625
[pypre]: 0.0625 0.25 0.375 0.25 0.0625
[pypost]: 0.25 0.5 0.25
[pyipol]: -0.0625 0.5625 0.5625 -0.0625

Anhang C

Gaswechsel - A/C_i -Kurven

Im Folgenden werden die Daten der A/C_i -Kurven für die einzelnen Pflanzen (Blattposition 9-10; $n = 6$) nochmals aufgeführt, um die individuellen Unterschiede insbesondere der RNAi-PIP2-Pflanzen gegenüber dem WT zu zeigen. Die RNAi-PIP2-Pflanzen wiesen die größeren Varianzen gegenüber den WT-Pflanzen auf.

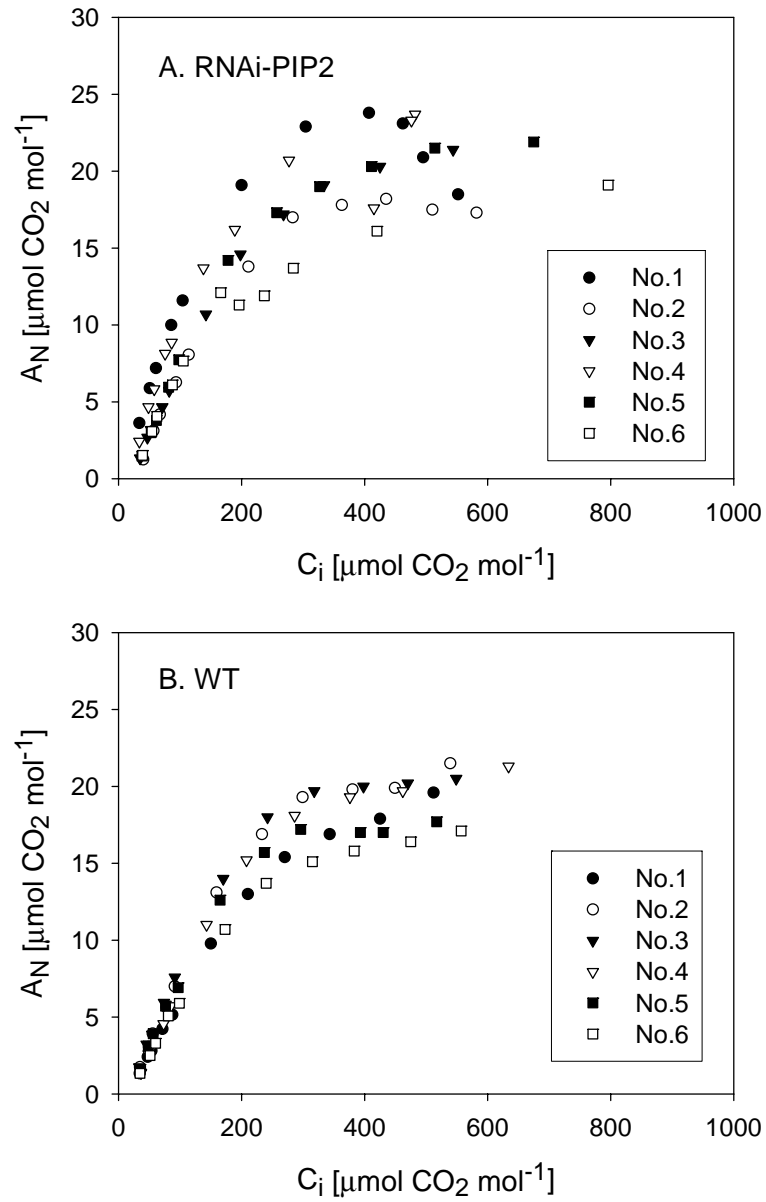


Abbildung C.1: A/C_i -Kurven der einzelnen Pflanzen der verschiedenen Tabaklinien. Abb. A.) zeigt die RNAi-PIP2-Pflanzen, Abb. B.) die WT-Pflanzen). Daten der Blattposition 9-10. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung zwischen 35 und 39 Tage alt.

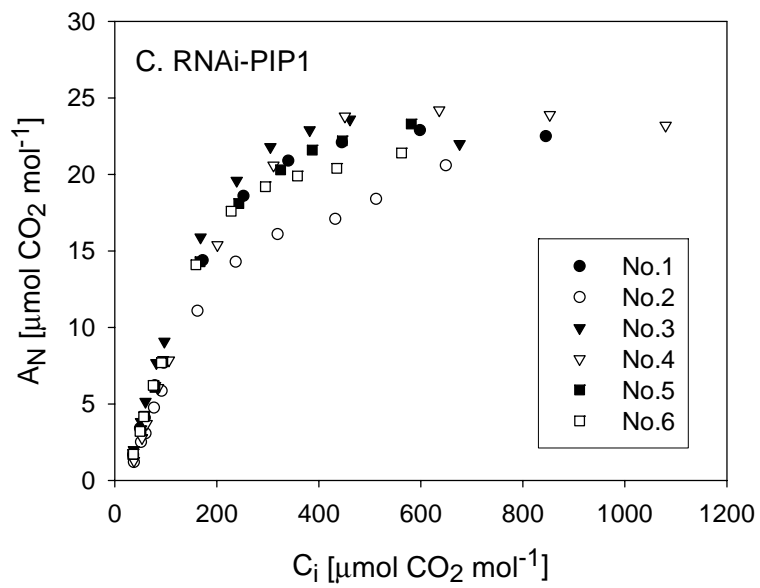


Abbildung C.2: A/C_i -Kurven der einzelnen Pflanzen der verschiedenen Tabaklinien. Abb. C.) zeigt die RNAi-PIP1-Pflanzen. Daten der Blattposition 9-10. Die Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Messung zwischen 35 und 39 Tage alt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und überhaupt alles

Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr dafür, dass er mir diese Arbeit erst ermöglicht hat, seine Betreuung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit

Herrn Prof. Dr. Ulrich Lüttge für seine Bereitschaft das Korreferat zu übernehmen

Achim Walter für die warmherzige Betreuung, seine Kritik und die vielen Schulterklopfer

Meinen Kollegen Kerstin Nagel, Maja Christ, Roland Pieruschka, I-Ling Lai, Olivia Virnich, Frank Gilmer, Maria Naumann, Susanne Tittmann, Markus Berns, Lilian Schmidt, Kathrin Cloos, Richard Poiré, Thomas Bodewein und Sabine Stollwerk, Shizue Matsubara, Imke Koch, Bernd Biskup, Andreas Fischbach, Georg Dreissen, Uwe Weller, Hanno Scharr und Beate Uhlig, und allen anderen Mitarbeitern des ICG3 möchte ich danken für ihre Hilfsbereitschaft und dafür, dass sie mein Seufzen ausgehalten haben und für die vielen schönen, „ineffizienten“ Momente ...

Sigi Jahnke, Uwe Rascher und Wilfried Wolff für ihre Gaswechsel-, Photosynthese- und Statistik Hilfe und die vielen Diskussionen

Herrn Leubner vielen Dank für seine Hilfe bei dem Keimungsexperiment

Ingar Janzig, Anika Wiese, Sabine Preiskowski und Andrea Neuwohner, die mir einen Arbeitsplatz im Mol.Bio.-Labor zur Verfügung gestellt haben und mir in allen Fragen der Mol.Bio. geholfen haben (jetzt weiß ich auch woher die schwarzen Streifen kommen..)

Norbert Uehlein, Beate Otto und Elisabeth Kruse für ihre Unterstützung in Sachen Aquaporinen

Thorsten, Heidrun und Detlef möchte ich ganz besonders für ihre Geduld und ihre Unterstützung während meines Studiums danken, ohne die ich es bestimmt nicht geschafft hätte

LEBENS LAUF

Name: Michaela Ernst

Geburtsdatum: 12.11.1972

Geburtsort: Krefeld

Schule: 1979 - 1983 Grundschule Krefeld-Lindental

1983 - 1993 Gymnasium Horkesgath Krefeld

1993 Abitur

Studium: 1994-2001 Biologie (Diplomstudiengang) mit Hauptfach Botanik
an der Universität zu Köln

09/2000 - 09/2001 Externe Diplomarbeit am Botanischen Institut Basel bei
Frau Prof. Dr. Stefanie Jacomet. Titel: „Zwischen Decken und Balken.
Eine archäobotanische Untersuchung von Druschresten aus neuzeitlichen
Fehlböden und spätmittelalterlichen Balkenlöchern in der Schweiz und de-
ren Aussagemöglichkeiten zur vorindustriellen Wirtschaftsweise.“

09/2001- 10/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Archäo-
botanik der Universität Basel.

11/2002 - 03/2003 Praktikum am Alfred-Wegener-Institut für Meeres- und
Polarforschung Bremerhaven

08/2003 - 10/2003 Praktikum beim Forschungs- und Technologie Zentrum
Westküste der Universität Kiel

ab 11/2003 am Forschungszentrum Jülich, Institut für Phytosphäre

2004 - 2007 Promotion bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff an der Technischen Uni-
versität Darmstadt und am Forschungszentrum Jülich, Institut für Phy-
tosphäre

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Köln, Mai 2007